



# Dynamique de la réponse immunitaire précoce mise en place localement suite à l'injection d'un vaccin ADN associée à une électroporation chez le macaque cynomolgus

Lucille Adam

## ► To cite this version:

Lucille Adam. Dynamique de la réponse immunitaire précoce mise en place localement suite à l'injection d'un vaccin ADN associée à une électroporation chez le macaque cynomolgus. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. <NNT : 2014PA114812>. <tel-01164996>

**HAL Id: tel-01164996**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01164996>**

Submitted on 18 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

**ECOLE DOCTORALE :**

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES*

**DISCIPLINE : Immunologie**

ANNÉE 2013-2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1276

**THÈSE DE DOCTORAT**

soutenue le 06/06/2014

par

**Lucille ADAM**

Dynamique de la réponse immunitaire précoce mise en place localement suite à l'injection d'un vaccin ADN associée à une électroporation chez le macaque cynomolgus

**Directeur de thèse :**

Roger Le Grand

Directeur de recherche (CEA Fontenay-aux-Roses)

**Co-directeur de thèse :**

Frédéric Martinon

Chargé de recherche INSERM (CEA Fontenay-aux-Roses)

**Composition du jury :**

*Président du jury :*

Olivier Lambotte

Professeur (Hôpital Bicêtre)

*Rapporteurs :*

Nicolas Bertho

Chargé de recherche (INRA Jouy-en-josas)

Jean-Daniel Levièvre

Professeur (Hôpital Henri Mondor)

*Examineurs :*

Olivier Epaulard

Praticien hospitalier-universitaire (Hôpital Grenoble)

Bertrand Bellier

Maître de conférences (Université Paris 6)

*Membres invités :*

Frédéric Martinon

Chargé de recherche INSERM (CEA Fontenay-aux-Roses)

## Remerciements :

Pour commencer je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Jean-Daniel Lelièvre et le Docteur Nicolas Bertho pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également le Docteur Olivier Epaulard et le Docteur Bertrand Bellier pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail. Olivier je te remercie de faire le voyage depuis Grenoble pour faire partie de mon jury. Je remercie également le Professeur Olivier Lambotte d'avoir accepté de présider ce jury.

Un Grand merci à mon directeur de thèse le Docteur Roger Le Grand pour m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire mais également pour sa disponibilité malgré un emploi du temps des plus chargés. Merci pour votre aide, votre patience, votre écoute pour la rédaction de mes papiers et de ma thèse. Vos conseils, votre avis et votre expérience m'ont été bien précieux.

Un merci très particulier à mon co-directeur de thèse Frédéric Martinon qui m'a chaleureusement accueillie dans son équipe et m'a permis de réaliser une thèse passionnante. Merci pour avoir supporté mon mauvais caractère et mon attitude parfois des plus bornées, je sais parfaitement que cela n'a pas toujours été facile. Vos conseils et vos corrections m'ont été essentiels pour la rédaction de ma thèse et de mes papiers surtout quand je m'égars dans tous les sens.

Je n'oublie pas les financements qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Merci à l'ANRS pour avoir financé mon projet et merci à Sidaction pour avoir financé ma thèse pendant 3 ans. Je remercie particulièrement les membres de l'équipe de Sidaction pour leur gentillesse mais aussi pour tout ce qu'ils apportent à leurs jeunes chercheurs. J'ai beaucoup apprécié que Sidaction nous ait montré autre chose que le côté scientifique de nos recherches, et permis de nous investir autrement par le biais des différentes interventions organisées et par les formations proposées, que j'ai trouvé vraiment passionnantes.

Cette thèse aurait sans nul doute été bien moins agréable sans les personnes qui j'y ai rencontré.

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire pour leur bonne humeur, leurs rires, leurs coups de gueule, leur gentillesse, tous ces petits moments qui font vivre ce laboratoire et qui y rendent le travail tellement plus agréable.

Merci à Antonio, Anne-Sophie, Benoit F, Pierre R, Catherine, Isabelle, Nathalie pour leurs discussions scientifiques, leur aide et leur disponibilité mais aussi pour leurs histoires partagées parfois juste tellement drôles.

Merci à toute l'équipe de techniciens pour leur aide indispensable au cours de mes manip mais également juste pour parler d'autres choses.

J'ai bien sûr une pensée bien particulière pour Biliana, Nina, Claire, Candice, Petit Pierre, Lamine, Gustavo, Francis, Céline<sup>2</sup>, Essia, Malvina, Manu, pour avoir rendu ces mois, ou ces années formidables, grâce à vous j'en garderai un merveilleux souvenir. Votre soutien et votre amitié ont été tellement importants pour moi. Et bien sûr je n'oublie pas l'aide précieuse que certains d'entre vous m'ont apportée! Cela fut un réel plaisir de travailler en votre compagnie. Ne plus vous voir tous les jours ne va pas être facile.

Je dirai donc qu'au cours de ces quelques années passées au sein de ce laboratoire j'ai rencontré des personnes formidables qui ne resteront pas de simples collègues de travail mais de véritables amis.

Mes copines de Fac je pense fort à vous !!! Vous qui avez toujours été là pour me soutenir pour me corriger et accessoirement me gribouiller la figure quand vous en aviez l'occasion, vous êtes vraiment supers!

Merci également à mes amis de Dreux qui depuis le temps n'habitent pour la plupart plus à Dreux mais c'est un bon point de référence. Merci pour votre patience et votre compréhension pendant mes mois de rédaction ! Vous m'avez beaucoup manqué !

Enfin, je pense très fort à ma famille. Sista merci pour ta gentillesse et ta compréhension, pour t'être occupée des choses que je n'avais pas le temps de faire. Un immense merci à mes parents pour leur soutien sans failles, leurs encouragements et leur aide pour bien des choses. Merci à mon cher Papa pour toutes tes petites attentions comme m'emmener à la gare aux aurores !!! Maman, qu'est-ce que j'aurais fait sans toi !!! Merci pour t'être montrée toujours disponible (et à toute heure) pour m'apporter ton aide. Je n'oublie pas ton courage dans la relecture du manuscrit, plus d'une fois... pour éliminer au mieux les incalculables fautes d'orthographe que je suis capable de faire dans une seule phrase ou pour en avoir parfois rajouté pensant que DC c'est masculin ☺ !!

Merci pour votre présence tout au cours de cette thèse !!!

INTRODUCTION .....	10
<b>A- Les mécanismes de la vaccination .....</b>	<b>10</b>
<b>B- La peau un organe de choix pour la vaccination .....</b>	<b>13</b>
I- La vaccination par voie intradermique.....	13
II- La peau .....	14
1. L'épiderme.....	15
2. La jonction dermo-épidermique et le derme .....	16
III- Les cellules importantes dans l'immunité de la peau .....	16
1. Les cellules présentatrices d'antigènes.....	16
a. Généralité sur les cellules dendritiques .....	16
b. Les DC de l'épiderme: Les cellules de Langerhans .....	19
c. Les cellules dendritiques du derme.....	23
d. Les monocytes/macrophages.....	26
2. Les lymphocytes de la peau.....	31
3. Les granulocytes ou cellules polynucléaires.....	33
4. Les kératinocytes .....	34
IV- Les Nœuds lymphatiques drainant la peau .....	36
<b>C- La vaccination et les besoins en stratégies innovantes .....</b>	<b>38</b>
I- Les stratégies de vaccination.....	38
1. Stratégies classiques.....	38
2. Les nouveaux vaccins .....	38
II- Les vaccins ADN.....	40
1. Principe et intérêt.....	40
2. Efficacité chez le petit animal de laboratoire .....	42
3. Efficacité chez les gros animaux de laboratoire et premiers essais chez l'homme .....	43
4. Stratégie permettant d'optimiser l'efficacité des vaccins ADN .....	44
a. Adjuvants.....	44
b. Système de délivrance.....	45
c. Optimisation du vecteur ADN .....	49
d. Stratégie de prime-boost.....	50
5. Le rôle des cellules transfectées.....	51
OBJECTIFS .....	53
APPROCHES EXPERIMENTALES.....	54

<b>A-</b>	<b>Le choix du modèle animal.....</b>	<b>54</b>
I-	Pertinence du modèle animal .....	54
II-	Le macaque .....	54
<b>B-</b>	<b>Le choix du modèle vaccinal.....</b>	<b>56</b>
I-	Le vaccin ADN anti-VIH auxo-GTUmultiHIV <sub>B</sub> .....	56
1.	Les vecteurs nucléiques GTU et auxo-GTU.....	56
2.	Le vecteur nucléique auxoGTUmultiHIV <sub>B</sub> .....	58
II-	Immunogénicité du vaccin auxo-GTU multiHIV <sub>B</sub> chez le macaque .....	58
1.	Réponse humorale .....	58
2.	Réponse cellulaire .....	59
III-	Production locale d'antigène .....	60
IV-	Choix de la stratégie de vaccination.....	61
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>62</b>
	<b>Article 1 : Electroporation mediated intradermal delivery of DNA vaccines in nonhuman primates .....</b>	<b>62</b>
	<b>Article 2: Development of a twelve-parameter flow cytometry panel to identify skin immune cells in non-human primates.....</b>	<b>70</b>
	<b>Article 3 : Dynamics of local immune response induce by intradermal auxoGTUmultiSIV DNA vaccine in association with local electroporation.....</b>	<b>101</b>
	<b>Article 4: Macrophage- and Neutrophil-Derived TNF-<math>\alpha</math> Instructs Skin Langerhans Cells to Prime Antiviral Immune Responses .....</b>	<b>141</b>
	<b>Résultats complémentaires.....</b>	<b>180</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>184</b>
I-	Caractérisation des cellules immunitaires cutanées chez le macaque cynomolgus et similarités avec les populations cutanées humaines .....	184
II-	Etude de la dynamique de la réponse immunitaire locale induite par le vaccin auxoGTU administré par voie intradermique en association à une électroporation (EP) locale. ....	186
1.	Évènements cellulaires et moléculaires au niveau du site de vaccination .....	186
2.	IDEC ou précurseurs de LC.....	191
3.	L'implication de l'EP et de l'ADN dans la réponse immunitaire précoce .....	192
III-	Le modèle animal et ses limites .....	195
IV-	Perspectives : La vaccination par le vaccin ADN auxo-GTU et l'électroporation .....	196
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>201</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>203</b>

## Table des figures :

Figure 1: Les « toll-Like Receptors » TLR .....	12
Figure 2: Structure de la peau. ....	15
Figure 3: Les cellules de Langerhans dans l'épiderme. ....	19
Figure 4 : schéma illustrant l'ontogénie des DC. ....	23
Figure 5: représentation schématique d'un nœud lymphatique drainant. ....	37
Figure 6: expression de l'Ag vaccinal dans les tissus. ....	41
Figure 7: Système de délivrance des vaccins ADN. ....	47
Figure 8 : plasmide vaccinal auxo-GTU®multiHIV <sub>B</sub> .....	57
Figure 9 : maintenance du vecteur GTU dans les cellules en division .....	58
Figure 10 : immunogénicité de type cellulaire induite par le vaccin auxo-GTU multiHIV <sub>B</sub> .....	60
Figure 11 : production de l'antigène vaccinal dans la peau. ....	61
Figure 12:coupe de nœud lymphatique 8 jours post vaccination.....	181
Figure 13: coupe de nœud lymphatique 29 jours post vaccination.....	183
Figure 14: TCR des cellules CD3 <sup>+</sup> de la peau.....	185
Figure 15: Cellules p24 positives dans le NL 3 et 8 jours post vaccination. ....	189
Figure 16: impact de la vaccination sur l'expression des gènes.....	194

## Table des tableaux :

Tableau 1: Phénotype et capacité de réponse aux ligands de TLR des DC et des macrophages.....	30
Tableau 2: exemples d'essais cliniques impliquant un candidat vaccin ADN. ....	51



### Liste des abréviations :

Ac : anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

Alum : cristaux de sels d'aluminium

APC : cellules présentatrices d'antigènes

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BDCA2 : « *blood DC antigen 2* »

BM : « *bone marrow* » moelle osseuse

BM-LC : LC dérivés des précurseurs de moelle osseuse

CCL : ligand de chemokine (C-C motif)

CCR : récepteur de chemokine (C-C motif)

CD : cluster differentiation

cDC : cellules dendritiques conventionnelles

CLA : « *cutaneous lymphocyte antigen* »

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CSF-1 : « *colony stimulating factor 1* »

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques

Da : dalton

DAMP : motifs moléculaires associés aux signaux de dangers/ dommages tissulaires

DC : cellules dendritiques

DC-LAMP : « *DC- Lysosome-associated membrane glycoprotein* »

DC-SIGN : « *DC-Specific Intracellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin* »

DDC: DC du derme

EP : électroporation

Flt3: récepteur du Flt3L

Flt3L : « *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand* »

FXIIIa: « *factor XIIIa* »

GM-CSF: « Granulocyte-macrophage colony stimulating factor »

GTU: « *gene transport unit* »

HEV : « *high endothelial venule* »

High : forte expression d'un marqueur  
HLA: antigènes des leucocytes humains  
HPV : « humanpapilloma virus »  
i.d : intradermique  
IFN : interféron  
IL : interleukine  
i.m : intramusculaire  
iNOS : nitrique oxyde synthase inductible  
IRF : Interferon regulatory factor  
LC : cellules de Langerhans  
NL : nœud lymphatique  
Low : faible expression d'un marqueur  
LPS : lipopolysaccharide  
LTB4 : leukotriène B4  
MCP-1: « *monocyte chemoattractant protein 1* »  
MD2 : myeloïd differentiation factor 2  
mDC : cellules dendritiques myéloïdes  
mid: expression modérée d'un marqueur  
MIP: « *macrophages inflammatory protein* »  
Mo: monocytes  
Mo-DC: DC dérivés des monocytes  
MVA : modification ankara du virus de la vaccine  
NET: « *Neutrophil extracellular Traps* »  
NFκB : nuclear factor-kappa B  
PNH: primate non-humain  
NK : natural killer  
NLR : récepteur de type NOD « *nucleotide oligomerization domain* »  
NO : monoxyde d'azote  
PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes  
pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes  
PGE2 : Prostaglandine E2  
PKR : protéine kinase R  
PMN : cellules polymorphonucléaires ou granulocytes  
Poly : IC : acide polyinosinique-polycytique  
Pré-cDC : précurseurs communs aux DC conventionnelles

PRR : « *pattern recognition recep*teur »

R848 : resiquimod

RIG-I : retinoic acid-inducible gene 1

s.c : sous-cutanée

SIDA : syndrome d'immunodéficience humaine

SLAN DC : « 6-sulfoLacNAc<sup>+</sup> DC »

TCR : récepteur cellulaire des lymphocytes T

TGF : « *transforming growth factor* »

Th : lymphocytes T auxiliaires « *T helper* »

TIP DC : « *TNF iNOS producing DC* »

TNF : facteur de nécrose tumoral « *tumor necrosis factor* »

TLR : récepteur de type Toll « *Toll like receptor* »

Treg : lymphocytes T régulateurs

TRIF : « *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  »

TXA2 : thromboxane A2

UV : ultra-violets

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLP : « *virus like particle* »

# INTRODUCTION

## A- Les mécanismes de la vaccination

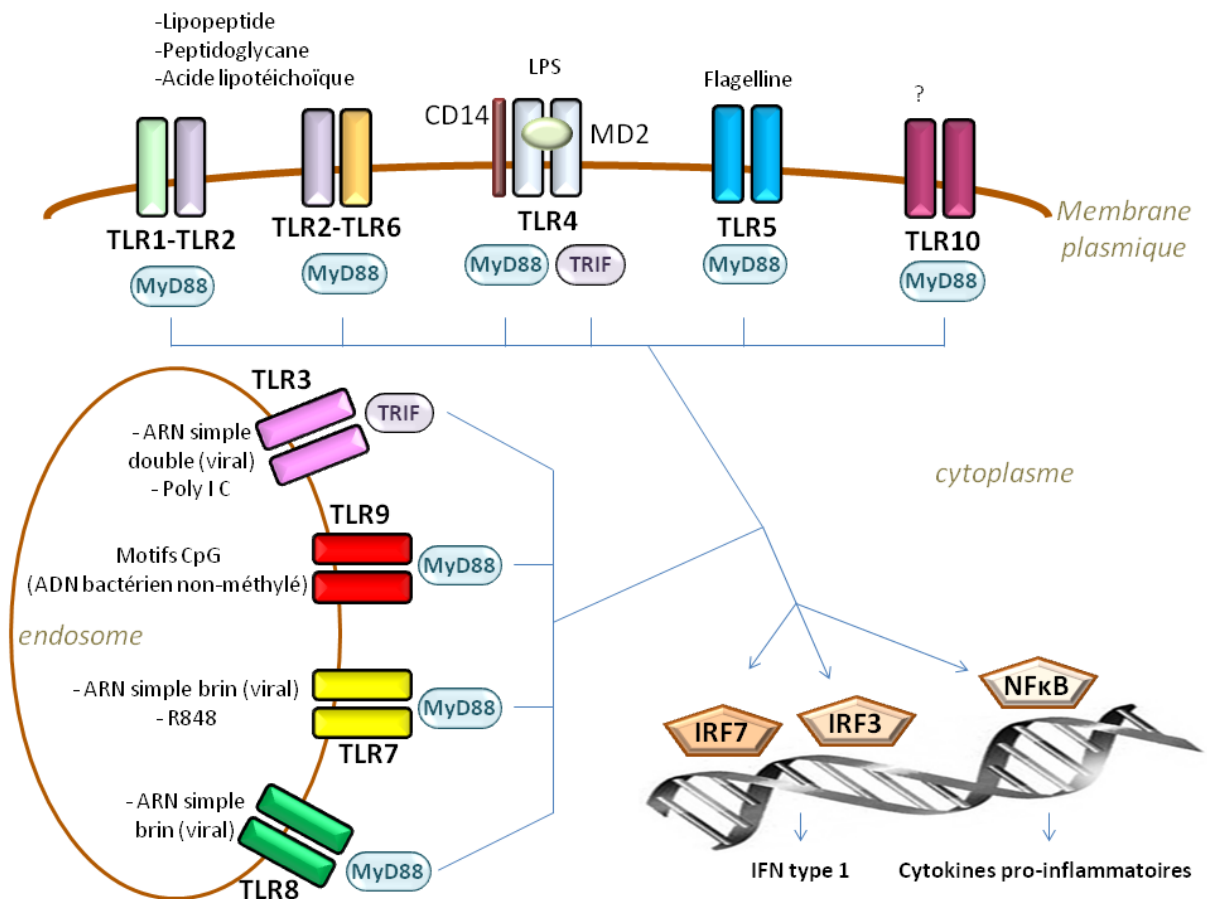
La vaccination reste à ce jour la mesure de santé publique la plus efficace, après l'eau potable, pour protéger les populations contre les maladies infectieuses. Cependant les mécanismes immunologiques impliqués dans la mise en place d'une réponse protectrice restent encore relativement méconnus. La compréhension de ces mécanismes qui déterminent l'orientation, l'intensité et la persistance de la réponse immune, points clés de l'efficacité d'un vaccin est donc essentielle.

De nombreux travaux démontrent l'importance des acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire innée intervenant précocement dans la réponse vaccinale et permettant l'établissement d'une immunité à long terme efficace. Les antigènes (Ag) vaccinaux et certains adjuvants présentent des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) reconnus par des récepteurs de reconnaissance de ces motifs ou « *Pattern Recognition Receptor* » (PRR) (Takeuchi and Akira, 2010), exprimés par les cellules de l'organisme. La reconnaissance des PAMPs par les PRR initie des cascades de signalisation cellulaire aboutissant à la synthèse de cytokines, chimiokines, molécules inflammatoires et antimicrobiennes. Les « *Toll-Like receptor* » (TLR) (Figure 1), « *Nod-Like Receptor* » (NLR), et lectines sont différents types de PRR (Cerboni et al., 2013; Delneste et al., 2007; Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; van Vliet et al., 2007). Tous les types cellulaires expriment des PRR (Takeuchi and Akira, 2010). Mais toutes les cellules ne les expriment pas tous, permettant ainsi une activation spécifique de certaines catégories de cellules exprimant une catégorie de PRR. Le vaccin contre la fièvre jaune YF-17D, reste à ce jour l'un des vaccins les plus efficaces (Gaucher et al., 2008; Theiler and Smith, 1937) et est largement étudié pour comprendre les mécanismes responsables de cette efficacité (Querec et al., 2006; Ravindran et al., 2014). L'équipe de Bali Pulendran a notamment démontré que de nombreux TLR étaient engagés dans la reconnaissance de la souche vaccinale induisant une activation de l'immunité innée particulièrement puissante, nécessaire à la forte réponse adaptative subséquente (Querec et al., 2006). En effet, de plus en plus de travaux démontrent l'importance de la synergie obtenue lors de la stimulation de plusieurs TLR dans l'intensité, la qualité et la persistance de la réponse immune induite (Napolitani et al., 2005; Orr et al., 2014; Kasturi et al., 2011; Moody et al., 2014) et de l'importance de ces stimulations multiples dans une même cellule (Vecchi et al., 2014; Kasturi et al., 2011).

De nombreux vaccins doivent être additionnés d'adjuvants pour qu'ils induisent une réponse immunitaire d'intensité suffisante. Les adjuvants ont pour rôle d'augmenter la réponse immune adaptative spécifique de l'Ag avec lequel ils sont combinés. Cependant bien souvent les mécanismes impliqués dans la stimulation de l'immunité par les adjuvants pourtant couramment utilisés en clinique restent non élucidés. L'un des adjuvants les plus répandus est constitué de cristaux de sels d'aluminium, l'Alum, et malgré plus de 80 années d'utilisation en vaccination, son mécanisme d'action reste controversé (Kuroda et al., 2013; Wang et al., 2013; Flach et al., 2011). L'Alum induit une réponse de type Th2 et favorise la réponse humorale. D'abord supposée augmenter l'immunogénicité des vaccins par un effet dépôt qui permettrait une délivrance prolongée de l'Ag, cette théorie est maintenant largement remise en question (Kuroda et al., 2013). En effet plusieurs études ont démontré que l'ablation du site d'injection d'un vaccin adjuvanté par l'Alum quelques heures post injection n'influait pas la réponse immune obtenue (Hutchison et al., 2012), remettant ainsi en cause le rôle de l'effet dépôt de l'Alum. Il semble que les cristaux d'Aluminium se lient avec une forte affinité exclusivement aux membranes de certaines populations cellulaires permettant ainsi la délivrance de l'Ag par endocytose et l'activation de ces cellules. Ce mécanisme d'action serait responsable du profil particulier induit par l'Alum (Flach et al., 2011). D'autres études suggèrent l'importance de l'ADN libéré dans le milieu lors de la mort cellulaire induite par l'Alum dans son effet adjuvant (Marichal et al., 2011). L'acide urique libéré suite à l'injection d'Alum est une également une molécule de « danger » indispensable au mécanisme adjuvant de l'Alum, permettant le recrutement et l'activation de certaines cellules immunitaires (Kool et al., 2008). L'exemple de l'Alum illustre que les mécanismes impliqués lors de la vaccination sont multiples et complexes démontrant la nécessité de mieux comprendre les événements précoces induits suite à une immunisation.

De nombreux autres adjuvants sont également à l'étude comme les ligands de TLR qui aboutissent généralement à une production d'interférons (IFN) de type I ou de cytokines pro-inflammatoires favorisant ainsi plutôt l'orientation de la réponse vers un profil Th1 (Baxevanis et al., 2013).

Ces quelques résultats montrent que notre connaissance des mécanismes impliqués suite à l'injection de vaccin progresse mais est encore loin d'être aboutie. Pourtant, la compréhension de ces mécanismes est un point essentiel pour permettre d'élaborer de nouvelles stratégies vaccinales plus efficaces notamment pour les maladies infectieuses pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun vaccin comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la malaria, ou pour lesquelles la vaccination est peu satisfaisante comme la tuberculose.



**Figure 1: Les « toll-Like Receptors » TLR**

Les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont exprimés à la surface des cellules tandis que les TLR3, 7, 8 et 9 sont exprimés en intracellulaires, sur la membrane des endosomes. Les TLR sont associés en homodimères ou hétérodimères. Le TLR4 est associé à une molécule accessoire, la « myeloïd differentiation factor 2 » (MD2) et au récepteur cellulaire CD14 pour pouvoir reconnaître son ligand, le LPS. Chaque TLR est relié à un adaptateur cellulaire permettant d'initier les différentes cascades de signalisation cellulaire. MyD88 et TRIF sont les adaptateurs principaux reliés aux TLR. Les cascades de signalisation aboutissent, selon l'adaptateur activé, à l'activation de facteur de transcription comme IRF7, IRF3 ou encore NFκB. Ces facteurs de transcription permettent la synthèse de molécules pro-inflammatoires ou d'IFN de type I (Delneste et al., 2007; Takeuchi and Akira, 2010; van Vliet et al., 2007).

## B- La peau un organe de choix pour la vaccination

### I- La vaccination par voie intradermique

Edward Jenner mis au point le premier vaccin en 1796. À cette époque le virus de la vaccine, le *cowpox*, responsable de la forme bovine de la variole était administré par voie cutanée (scarification) aux individus afin qu'ils développent une immunité capable de les protéger contre le virus *smallpox*, agent de la variole humaine, maladie avec une mortalité de 30%. Ce procédé de vaccination a été l'un des plus efficaces jamais mis au point et a permis l'éradication totale de la variole humaine (Smith, 2011, 2013). Il a également démontré l'intérêt de la voie cutanée pour l'administration du vaccin. De nos jours, l'administration des vaccins se fait généralement par voie intramusculaire (i.m) ou sous-cutanée (s.c) car l'injection i.m ou s.c est un geste simple à réaliser, bien toléré par les individus et permet d'induire des réponses immunitaires suffisamment efficaces, pour une majorité de vaccins actuellement disponibles. Cependant différentes études suggèrent que la voie d'immunisation peut influencer la qualité de la réponse adaptative. Elle peut donc représenter une approche de délivrance intéressante pour développer de nouveaux vaccins. Par exemple, la voie d'immunisation peut induire une expression différente de certaines molécules d'adressage aux tissus comme  $\alpha 4\beta 7$  (Bachy et al., 2013; Sigmundsdottir and Butcher, 2008) ou CCR10 (Sigmundsdottir and Butcher, 2008) par les lymphocytes spécifiques de l'Ag qui dirige ces cellules vers les muqueuses ou vers l'épiderme respectivement.

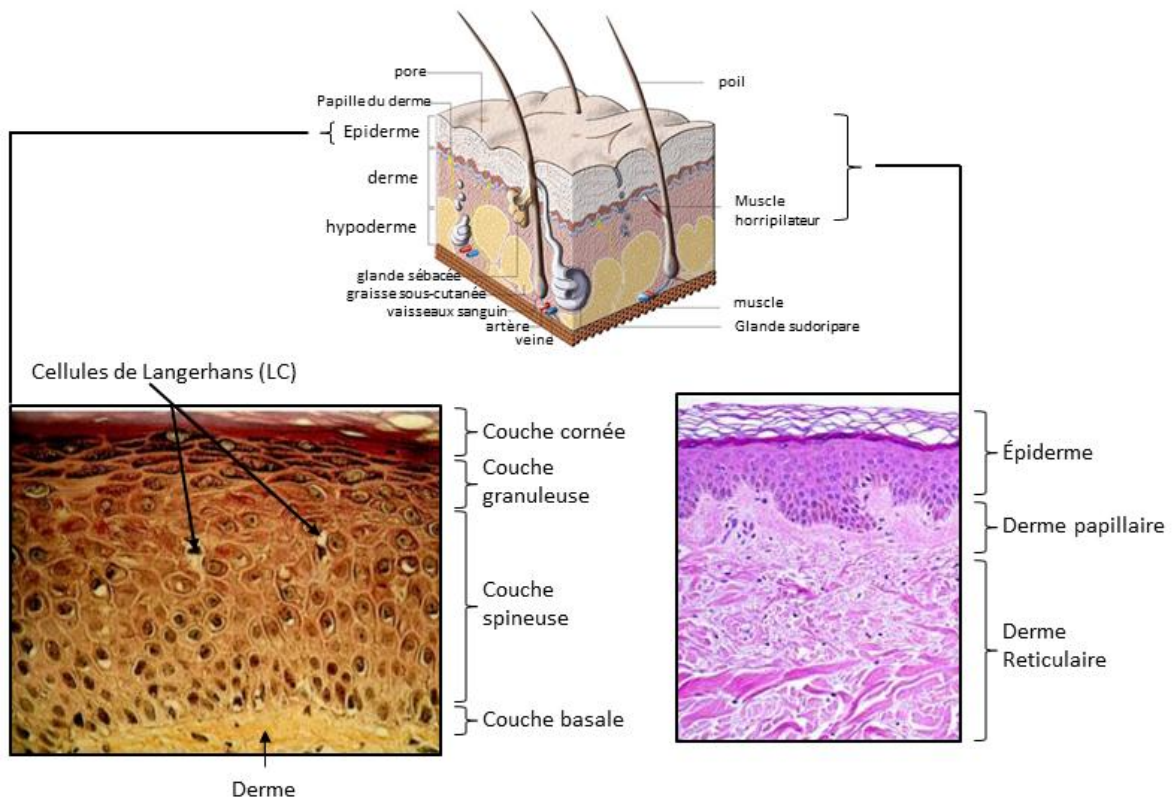
La peau est un organe facilement accessible et riche en cellules immunitaires. De nombreuses études montrent que l'injection d'un vaccin par voie intradermique (i.d) permet d'obtenir une réponse immunitaire, estimée le plus souvent par la quantité d'anticorps (Ac) induit, équivalente (Kis et al., 2012; Belshe et al., 2007) ou supérieure (Propst et al., 1998; Arnou et al., 2009) à celle obtenue par voie i.m ou s.c. Dans une majorité de cas, la dose d'Ag nécessaire pour obtenir ces réponses est significativement plus faible après injection i.d (Kurugöl et al., 2001; Pancharoen et al., 2005; Playford et al., 2002), ce qui présente un réel intérêt économique et de santé publique : un plus grand nombre de doses peut être obtenu par une même production. Dans le cas des vaccins saisonniers ou pandémiques, comme ceux contre la grippe, les nouveaux lots pourraient être disponibles plus rapidement pour une large proportion de la population exposée (Kurugöl et al., 2001; Pancharoen et al., 2005). D'une manière similaire, chez les personnes âgées (Arnou et al., 2009) ou sous dialyses (Propst et al., 1998), la voie i.d s'avère être plus efficace dans l'induction d'une réponse protectrice que la voie i.m. La voie i.d peut également induire une réponse immunitaire chez des individus non-répondeurs aux vaccins classiquement administrés par voie i.m (Playford et al., 2002). Malgré ces

avantages, la voie i.d n'est pas privilégiée pour la vaccination car l'injection intradermique est un geste technique plus difficile à maîtriser et demande donc un personnel entraîné. L'injection i.d est également plus douloureuse et entraîne des réactions locales qui peuvent persister plusieurs semaines (Playford et al., 2002). Néanmoins, les avancées technologiques ont permis l'élaboration de nouvelles méthodes d'administration cutanée, ou percutanée plus simples (Arnou et al., 2009; Kis et al., 2012), comme les patch à micro-aiguilles (Bachy et al., 2013; Laurent et al., 2010). Ces méthodes sont peu douloureuses voire indolores, ne nécessitent pas de personnels formés entraînés, sont reproductibles dans l'administration de la dose vaccinale et la réponse immune induite (Kis et al., 2012).

## II- La peau

La peau est une barrière relativement hermétique permettant de protéger l'organisme du milieu extérieur notamment contre les microorganismes, le dessèchement, les radiations lumineuses et autres agressions physiques ou chimiques (Morita et al., 2011; Brandner et al., 2002; Elias et al., 2001). Elle reste cependant perméable aux petites molécules inférieures à 500 Da (Kis et al., 2012). La peau est constituée de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique, du derme et de l'hypoderme. Elle contient un certain nombre de follicules pilo-sébacés principalement situés dans le derme et l'hypoderme (figure 2) (Prost-Squarcioni, 2006). L'intérêt de la peau pour la vaccination réside principalement dans sa richesse en cellules immunitaires et notamment en cellules dendritiques, qui sont les piliers centraux de l'immunité.





**Figure 2: Structure de la peau.**

Schéma représentatif de l'organisation de la peau d'après <http://www.naturelcosmetik.com/> (A). Coupe histologique de l'épiderme et représentation des différentes couches (Démarchez, 2011) (B). Coupe histologique de l'épiderme et du derme avec représentation des différentes couches de derme d'après <http://www.scienceprog.com/skin-structure/> (C).

## 1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de revêtement pavimenteux pluristratifié non vascularisé mais innervé (figure 2). Il est constitué de kératinocytes, cellules de structure (Morita et al., 2011) ayant un rôle essentiel dans les réponses immunitaires (Gutowska-Owsiak and Ogg, 2012), de mélanocytes, cellules fabriquant les pigments cutanés et ayant un rôle photo-protecteur, de cellules de Merkel, intervenant dans l'innervation et de cellules immunitaires, les cellules de Langerhans et les lymphocytes (Prost-Squarcioni, 2006; Démarchez, 2011).

## 2. La jonction dermo-épidermique et le derme

Entre l'épiderme et le derme se trouve la couche basale, première couche de cellules de l'épiderme. À sa base, la membrane basale forme la jonction dermo-épidermique, jonction relativement complexe où l'épiderme s'ancre dans le derme par des molécules d'adhésions liées à des filaments du cytosquelette cellulaire pour former des hémidesmosomes (Démarchez, 2011). La jonction dermo-épidermique apparaît comme une ligne ondulée où s'alternent les saillies de l'épiderme dans le derme et inversement, l'ensemble formant le derme papillaire (figure 3). Le derme est un tissu conjonctif dont la matrice extracellulaire est très abondante souple et élastique (Shimizu, 2007). Le derme superficiel est constitué d'un tissu conjonctif lâche et le derme profond d'un tissu conjonctif dense, suivi sans limite franche de l'hypoderme, riche en adipocytes. La matrice extracellulaire est riche en collagènes, fibres élastiques, et réticulines (Shimizu, 2007; Prost-Squarcioni, 2006). Le derme comporte des cellules fixes (comme les fibroblastes et les adipocytes) et mobiles (comme les macrophages, les cellules dendritiques du derme (DDC), les mastocytes, les granulocytes et les lymphocytes (Prost-Squarcioni, 2006; Kupper and Fuhlbrigge, 2004).

### III- Les cellules importantes dans l'immunité de la peau

#### 1. Les cellules présentatrices d'antigènes

##### a. Généralité sur les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) forment une population de cellules présentatrices d'Ag (APC) très hétérogène (Haniffa et al., 2012; MacDonald et al., 2002; Ueno et al., 2010; Ju et al., 2010) qui sont présentes dans la plupart des tissus (Banchereau and Steinman, 1998) à très faible fréquence (Steinman and Witmer, 1978). Ce sont les seules cellules capables d'activer un lymphocyte T naïf en lui présentant l'Ag dont il est spécifique (Steinman and Witmer, 1978). Dans les tissus, les DC résident à un stade immature où elles ont un rôle de sentinelle. Très mobiles, elles sont capables de sonder le microenvironnement à l'aide de leurs longues extensions cytoplasmiques (dendrites) qu'elles rétractent et étendent (Banchereau and Steinman, 1998). À ce stade, elles sont capables de capturer un Ag et de l'apprêter, pour présenter à leur surface des épitopes de l'Ag associés aux molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Classiquement, on distingue deux voies de présentation des Ag en fonction de leur origine endogène ou exogène. La voie exogène est l'exclusivité des cellules phagocytaires, notamment des DC, et

aboutit à la présentation de l'Ag par les molécules CMH-II afin d'activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les Ag endogènes, néo synthétisés par les cellules, suivent une autre voie et sont associés aux molécules du CMH-I, permettant l'interaction et l'activation d'un lymphocyte T CD8<sup>+</sup> (Zinkernagel and Doherty, 1974). Cependant, cette voie ne permet pas l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs si la cellule présentatrice n'est pas une DC. Ce qui est très fréquent en cas d'infection virale ou de transformation tumorale. La cross-présentation est un autre mécanisme par lequel les APC présentent un Ag exogène par le CMH-I et ainsi activent efficacement la réponse CTL (Bevan, 1976; Haniffa et al., 2012; Jongbloed et al., 2010; Kurts et al., 2010). Un autre mécanisme a été plus récemment mis en évidence : le cross-dressing. Ce mécanisme permet également d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et ce d'une façon plus efficace que la cross-présentation (Dolan et al., 2006). Lors du cross-dressing, la DC acquiert directement le complexe CMH-I-peptide d'une autre cellule et présente ce complexe à sa surface pour activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Dolan, 2011; Dolan et al., 2006; Wakim and Bevan, 2011).

Les DC expriment un large panel de PRR leur permettant de répondre à toutes les catégories de pathogènes (Cerboni et al., 2013). Selon les récepteurs engagés dans la reconnaissance, la voie de signalisation activée engendre la production de différentes classes de cytokines et chimiokines (Kapsenberg, 2003). Suite à la capture de l'Ag, la DC perd une partie de ses capacités de phagocytose et de reconnaissance des pathogènes mais elle mature, gagnant ainsi la capacité d'activer les lymphocytes naïfs. Durant la maturation, les DC augmentent l'expression du CCR7, récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21 exprimées par les cellules endothéliales et, plus particulièrement au niveau des nœuds lymphatiques, permettant ainsi aux DC de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Geissmann et al., 2002) pour y rencontrer les lymphocytes. Elles augmentent également leur expression pour le CMH-I et II pour présenter d'une façon optimale l'Ag aux lymphocytes T. Elles surexpriment les molécules de costimulation (adhésion et transduction du signal) indispensables à l'activation des lymphocytes T, comme CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1), CD40 (Banchereau and Steinman, 1998; Salomon and Bluestone, 2001).

Si les DC ont un rôle essentiel dans l'induction d'une réponse immunitaire, elles ont un rôle tout autant primordial dans l'induction d'une réponse tolérogène (Steinman et al., 2003). Elles peuvent induire la tolérance vis-à-vis de certains Ag du non soi, comme la flore commensale, ou les Ag du soi. En effet en l'absence de signaux de danger et d'inflammation, les DC s'activent mais ne mûrissent pas totalement. Lorsqu'elles rencontrent un lymphocyte spécifique, leur manque de maturation induit une anergie de ce dernier, qui sera réfractaire à toute stimulation ultérieure par une DC mature (Jonuleit et al., 2000; Hawiger et al., 2001). Ceci est illustré en condition normale, où les DC capturent

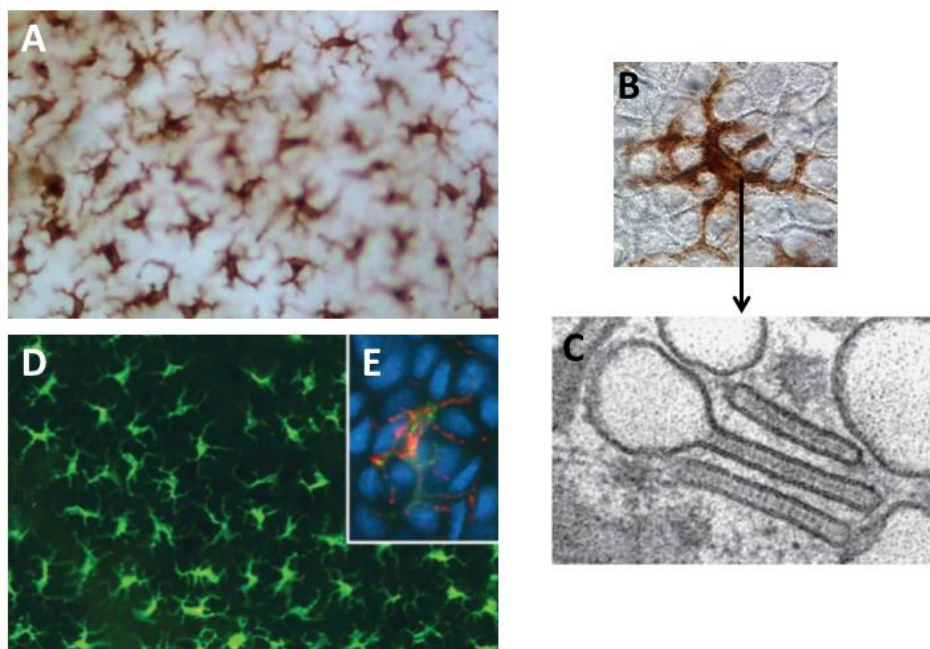
et présentent des Ag du soi, induisant leur tolérance (Ueno et al., 2010). La tolérance peut également être induite par une activation particulière de la DC et par le type de cytokines produites par des DC matures qui peuvent alors orienter la différenciation des lymphocytes en T régulateurs (Treg), aux propriétés anti-inflammatoires (Banchereau and Steinman, 1998; Jonuleit et al., 2000). Par ces mécanismes, les DC participent activement au maintien et au retour à l'homéostasie et limitent les réactions auto-immunes (Seneschal et al., 2012; Shklovskaya et al., 2011; Hawiger et al., 2001).

La classification des DC est délicate et souvent controversée par les auteurs car il n'existe aucun marqueur spécifique de cette population hétérogène (Hume, 2008). Les DC sont néanmoins caractérisées par une absence d'expression pour certains marqueurs associés aux populations lymphocytaires, comme chez l'homme : CD3, CD56, CD20, CD19, CD8 et par l'expression du CMH-II (HLA-DR) (Ju et al., 2010; MacDonald et al., 2002). Les DC sont classées dans deux grandes catégories : les DC myéloïdes (mDC) ou conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les pDC sont caractérisées chez l'homme par l'expression du CD123 et du BDCA2. Elles expriment également le TLR7 et le TLR9 (Ju et al., 2010; Flacher et al., 2006) (tableau 1) ainsi que le « retinoic acid-inducible gene 1 » (RIG-I), un arsenal leur permettant de reconnaître les agents viraux (Cerboni et al., 2013). Elles sont spécialisées dans la synthèse d'interférons (IFN) de type I (Ueno et al., 2010; Siegal et al., 1999), cytokines ayant un rôle antiviral direct et influençant l'orientation de la réponse vers un profil Th1, primordial dans la réponse naturelle antivirale (Haniffa et al., 2013; Siegal et al., 1999). Les pDC sont une population relativement rare, absente dans les tissus périphériques à l'état basal. Elles sont présentes en faible quantité dans le sang, et sont plus abondantes dans les organes lymphoïdes secondaires (Ju et al., 2010; Conrad et al., 2009). Dans la peau ces cellules sont normalement recrutées en cas d'inflammation mais ne sont pas résidentes du tissu cutané (Conrad et al., 2009). Cependant elles sont présentes en cas d'inflammation chronique comme en cas de dermatite atypique (Guttman-Yassky et al., 2007). Les cDC, caractérisées par l'expression du CD11c (Merad et al., 2013) forment une population bien plus hétérogène où un certain nombre de sous-populations ont pu être identifiées (Haniffa et al., 2013). Ces sous populations diffèrent de par l'expression de certains marqueurs et leur localisation. En effet, des sous populations exprimant CD11c (BDCA1), CD141 (BDCA3), CD14, CD1a, CD16 ont été mises en évidence dans les différents organes, tissus ou compartiment sanguin (Ueno et al., 2010; Autissier et al., 2010a). Ces sous populations expriment des niveaux différents de molécules d'activation et de maturation. Bien que les cDC expriment un panel riche et varié de PRR, les différentes sous populations n'expriment pas les mêmes classes de lectines (Romain et al., 2012; van Vliet et al., 2007) et de TLR (Flacher et al., 2006; Ueno et al., 2010). Ces différentes sous-populations de DC ne présentent pas non plus les

mêmes capacités de stimulation des lymphocytes T (Haniffa et al., 2012; Ueno et al., 2010; Gao et al., 2013).

#### b. Les DC de l'épiderme: Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) sont les seules APC présentes dans l'épiderme. Elles sont radorésistantes mais sensibles aux UV (Valladeau, 2006; Merad et al., 2002). Elles représentent entre 2 et 4 % des cellules de l'épiderme et forment un réseau dense de cellules de forme étoilée avec de longues dendrites s'étendant entre les kératinocytes et un corps cellulaire de petite taille (Valladeau, 2006) (Figure 3). Il a été montré que les LC pouvaient étendre leurs dendrites à travers les jonctions serrées entre les kératinocytes pour capturer les Ag à la surface de l'épiderme comme les microorganismes commensaux ou pathogènes, ou encore, des Ag vaccinaux (Shklovskaya et al., 2011; Ouchi et al., 2011; Kubo et al., 2009). Ces cellules possèdent des organites intracytoplasmiques spécifiques permettant de les identifier : les granules de Birbeck (Birbeck et al., 1961) (Figure 3).



**Figure 3: Les cellules de Langerhans dans l'épiderme.**

Le marquage immunohistochimique du CD207 (A et B) dans l'épiderme humain permet de visualiser le réseau de LC (A) et montre la morphologie très caractéristique des LC avec un petit corps cellulaire et de longues dendrites infiltrées entre les kératinocytes (B). Par microscopie électronique à transmission, les granules de birbeck sont visualisés. Ils présentent une forme de racket de tennis et sont typiques des LC (C). Le marquage du CMH II (vert) par Immunohistofluorescence dans l'épiderme de souris (D et E) permet de visualiser le réseau de LC (D). Le comarquage entre le CMH II (vert) et la langérine (rouge) est également mis en évidence. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (bleu) (E). (Romani et al., 2010; Pearton et al., 2010)

Cette population de DC exprime le CD45, marqueur des leucocytes, et le CD33, le CD13 et le CD11c de façon plus modérée, marqueurs associés à la lignée myéloïde (Valladeau, 2006). Chez l'homme, les LC sont caractérisées par une forte expression de HLA-DR, CD1a et de la langérine (CD207) (Klechevsky et al., 2008). Actuellement le CD207 n'a été identifié dans la peau humaine que dans les cellules de Langerhans, bien que chez la souris, plusieurs sous-populations de DC distinctes des Langerhans expriment ce marqueur (Henri et al., 2010; Nagao et al., 2009; Bursch et al., 2007). Les LC expriment également la E-Cadherine (Klechevsky et al., 2008; Bobr et al., 2012) et la Ep-CAM (Nagao et al., 2009; Chu et al., 2011), des molécules d'adhésions permettant leur interaction avec les kératinocytes (Valladeau and Saeland, 2005). Lors du processus de migration, les LC rétractent leurs dendrites et quittent l'épiderme (Pearton et al., 2010) pour se rendre dans le nœud lymphatique (NL) drainant la région cutanée, où elles présentent l'Ag aux lymphocytes T (Villablanca and Mora, 2008). La migration est associée à une diminution de l'expression de la E-Cadherine et de la Ep-CAM (Bobr et al., 2012) et à des signaux cytokiniques et chimiokines (Griffiths et al., 2005). Les cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  jouent un rôle essentiel dans le processus de migration de ces cellules (Villablanca and Mora, 2008; Cumberbatch et al., 1997). En effet lors d'une activation, les LC produisent de l'IL-1 $\beta$ , qui se fixe sur son récepteur exprimé par les kératinocytes. Les kératinocytes produisent en réponse du TNF- $\alpha$ , qui interagit avec le récepteur au TNF exprimé par les LC et ainsi permet leur migration (Griffiths et al., 2005; Cumberbatch et al., 1997). L'interaction entre les chimiokines et leurs récepteurs à la surface des LC est une autre composante indispensable à la migration des LC. Il a été montré chez l'homme par Ouwehand et son équipe, que lors d'une inflammation, le départ des LC de l'épiderme vers le derme est dépendante de l'interaction entre le CXCR4, surexprimé par les LC en condition inflammatoire et son ligand le CXCL12 produit par les fibroblastes au cours de l'inflammation (Ouwehand et al., 2008). En outre, la surexpression du CCR7 par les LC n'a lieu que dans une phase tardive de la maturation des LC, quand celles-ci sont dans le derme (Ouwehand et al., 2008). À ce stade, l'entrée des LC dans les vaisseaux lymphatiques ainsi que leur migration dans les NL est dépendante de leur expression du CCR7 qui interagit avec les chimiokines CCL19 et CCL21 (Villablanca and Mora, 2008; Griffiths et al., 2005). Même en condition normale, des LC sont présentes dans les NL (Ohl et al., 2004), ce qui montre que ces cellules peuvent quitter l'épiderme pour migrer dans les NL en absence d'inflammation et de signaux de danger (Zaba et al., 2009).

Beaucoup de travaux ont été menés pour comprendre l'origine des LC et leur renouvellement (Merad et al., 2008), qui est distinct des autres types de DC (Haniffa et al., 2013) (Figure 4), en condition normale et inflammatoire chez la souris. Bien que leur origine ait longtemps été

controversée, il est maintenant admis que les LC sont des cellules d'origine myéloïde (Hoeffel et al., 2012). Cependant, contrairement aux autres DC, les LC ne sont pas dépendantes du flt3L et de son récepteur (Ginhoux et al., 2009). Par contre leur établissement et leur maintenance sont dépendants de l'interaction entre le récepteur du CFS-1 et l'IL34 comme le montre les travaux obtenus chez la souris (Greter et al., 2012). Le TGF- $\beta$ 1 est également essentiel dans l'homéostasie des LC (Kaplan et al., 2007). Les études réalisées chez la souris montrent que l'établissement des LC dans l'épiderme se fait avant la naissance. Une première vague de précurseurs provenant du sac vitellin colonise l'épiderme embryonnaire puis une deuxième et majoritaire vague de précurseurs provenant du foie fœtal colonise à son tour cet épiderme (Hoeffel et al., 2012), établissant ainsi les pools de précurseurs de LC qui renouvelleront les LC dans l'épiderme après la naissance et durant la vie adulte en condition physiologique.

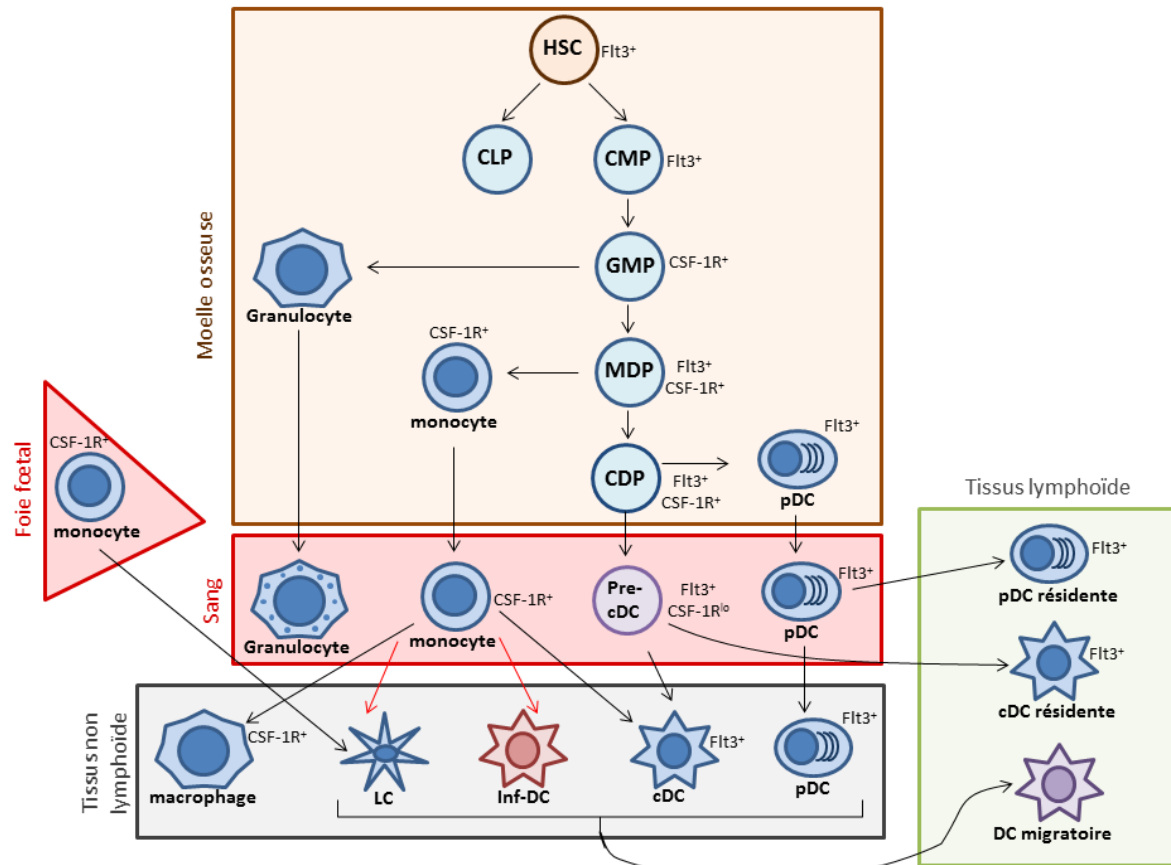
Lors d'une blessure, d'un traitement aux UV, d'une immunisation, les LC peuvent être mobilisées et quitter l'épiderme en réponse à ces conditions inflammatoires. Le repeuplement de l'épiderme par de nouvelles LC se fait en deux temps comme démontré dans le modèle murin. Premièrement, des précurseurs sanguins, les monocytes inflammatoires (CCR2<sup>+</sup>) migrent très rapidement dans l'épiderme et se différencient pour donner des LC à courte durée de vie, qui disparaissent au bout de quelques semaines. Ces cellules expriment un faible niveau de CD207, et d'Ep-CAM et un fort niveau de CD11b. Cette première vague est suivie d'un recrutement dans l'épiderme de précurseurs de la moelle osseuse qui donneront eux les LC à longue durée de vie. Ces LC expriment quant à elles fortement le CD207 et Ep-CAM et expriment plus faiblement le CD11b. Le renouvellement des LC en condition inflammatoire se fait donc à partir de 2 précurseurs différents (Seré et al., 2012). En condition normale, les LC ont un taux d'auto-renouvellement très lent, ce qui est montré dans des modèles de greffe de peau chez la souris et chez l'homme où les LC d'origine du donneur restent dans l'épiderme pendant plusieurs mois voire plusieurs années en absence d'inflammation (Koch et al., 2006). Toujours en absence d'inflammation, les modèles de greffe de moelle montrent que les LC restent d'origine du receveur et ne sont pas remplacées par des précurseurs de moelle osseuse (Helft et al., 2010; Merad et al., 2002). Les expériences chez les souris parabiotiques, montrent elles aussi, qu'il n'y a pas de mélange de LC donneur/receveur, et que malgré une circulation sanguine commune, les LC des deux individus restent dans leur épiderme respectif (Helft et al., 2010; Merad et al., 2002). Ces résultats confirment l'existence de précurseurs locaux capables de renouveler le stock de LC en condition normale. En effet 2 à 3% des LC sont en cycle, témoignant de leur capacité à se multiplier (Merad et al., 2008; Helft et al., 2010). Par contre après inflammation, les LC présentent les mêmes origines que les cellules de moelle et sont donc renouvelées par des précurseurs circulants

(Merad et al., 2002). Ces résultats tendent à montrer qu'il existe plusieurs précurseurs différents capables de renouveler le stock de LC en condition normale et en condition inflammatoire.

Bien que les LC aient été beaucoup étudiées *in vivo*, chez la souris et chez l'homme et *in vitro*, à partir de LC dérivées de précurseurs CD34<sup>+</sup> (BM-LC) ou de monocytes sanguins (Mo-LC), leurs fonctions immunologiques restent controversées. Les LC sont capables *in vitro* d'induire une prolifération et une activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers un profil Th2 chez l'homme, en sécrétant dans le milieu de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Klechevsky et al., 2008) et d'induire une réponse humorale chez la souris *in vivo* (Nagao et al., 2009). Elles produisent de l'IL-15, cytokine nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et sont très performantes pour induire leur prolifération et différenciation en lymphocytes cytotoxiques (CTL) comme le montrent les études réalisées avec des LC humaines (Klechevsky et al., 2008; Banchereau et al., 2012). D'autres équipes ont également montré leur capacité à induire une réponse de type Th17 (Mathers et al., 2009; Klechevsky, 2013) et Th22 (Fujita et al., 2009; Klechevsky, 2013) chez l'homme. L'équipe de Nagao a également démontré l'importance des LC murine dans l'induction d'une réponse humorale protectrice, totalement abolie en cas de déplétion de cette sous-population de DC (Ouchi et al., 2011). Les études réalisées chez l'homme sur la capacité de cross-présentation des LC ne sont pas toutes en accord, bien que certains les décrivent comme d'excellentes cellules cross-présentatrices (Klechevsky et al., 2008), d'autres démontrent leur modeste capacité dans ce domaine par rapport à d'autres populations de DC du derme (Haniffa et al., 2012). Des études montrent également l'importance des LC dans le maintien de la tolérance chez l'homme (Seneschal et al., 2012) et chez la souris (Shklovskaya et al., 2011). Fasekas de St Groth et son équipe ont montré *in vitro* et *in vivo* le rôle des LC dans l'induction de la tolérance. Dans des conditions expérimentales où seules les LC présentent l'Ag, sans rupture de la barrière cutanée, les LC s'activent et mûrissent mais sont incapables, malgré l'ajout d'adjuvant, d'induire la différenciation des lymphocytes T en effecteurs et en cellules mémoires, contribuant ainsi au maintien de la tolérance (Shklovskaya et al., 2011).

Les LC contribuent donc à l'induction de réponses de type humoral, cellulaire et tolérogène. Il semble que les conditions d'activation et de maturation des LC ainsi que la contribution d'autres populations de DC influencent grandement l'orientation de la réponse immunitaire médiée par ces cellules.





**Figure 4 : schéma illustrant l'ontogénie des DC.**

Les progéniteurs lymphoïdes « common lymphoid progenitor » (CLP) et myéloïdes « common myeloid progenitor » (CMP) sont obtenus à partir d'une cellule souche (HSC). Les CMP donnent naissance aux progéniteurs des granulocytes et des macrophages (GMP). Les GMP se différencient par la suite en granulocytes et en progéniteurs communs aux monocytes/macrophages et aux DC (MDP). Les MDP se différencient en monocytes et en précurseurs communs des cDC (CDP). Les CDP donnent naissance aux pré-cDC (cDC du sang) et en pDC. Les pré-cDC une fois dans les tissus (lymphoïdes et non lymphoïdes) donnent les cDC résidentes. Les monocytes peuvent, selon les conditions aboutir à des macrophages, des cDC, des DC inflammatoire (inf-DC) ou des cellules de Langerhans (LC) (Merad et al., 2013; Haniffa et al., 2013). Par ailleurs, les études murines montrent que les monocytes du foie fœtal constituent le pool de LC qui se forme avant la naissance (Hoeffel et al., 2012).

Les flèches noires indiquent la différenciation des cellules en condition physiologique et les flèches rouges en condition inflammatoire.

### c. Les cellules dendritiques du derme

Les cellules dendritiques du derme ont été identifiées dans les années 90, comme des cellules n'exprimant pas les marqueurs de la lignée lymphocytaire, ni un certain nombre de marqueurs associés aux macrophages. En revanche, ces cellules expriment fortement le CMH de classe II, le

CD33 (marqueur myéloïde), le CD11c, et sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes T (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993). Dès 1993, Nestle et ses collaborateurs mettent en évidence la présence de plusieurs sous-populations de cellules dendritiques dermales (DDC) (Nestle et al., 1993). En effet chez l'homme 2 sous populations de DDC exprimant de façon exclusive le CD1a et le CD14 ont été identifiées et particulièrement bien caractérisées (Klechevsky et al., 2008; Angel et al., 2007; Nestle et al., 1993; Banchereau et al., 2012). La population majoritaire exprime le CD1a le CD11c mais pas le CD14 (DDC CD1a<sup>+</sup>) et la population minoritaire exprime le CD14, le CD11c mais pas le CD1a (DDC CD14<sup>+</sup>) (Klechevsky et al., 2008). Les DDC CD14<sup>+</sup> se rapprochent des macrophages par un certain nombre de caractéristiques (Haniffa et al., 2013) comme leur morphologie, très similaire aux macrophages, leur expression de DC-SIGN (CD209), comme les macrophages du derme, une faible expression de CD163. La non-expression du CD1c par cette population, marqueur des cDC est cependant controversée (Klechevsky et al., 2008; Haniffa et al., 2009). Les DDC CD1a<sup>+</sup> expriment le CD1a à un niveau plus faible par rapport aux LC et n'expriment ni le CD207 ni DC-SIGN et sont positives pour le CD1c. Les DDC CD1a<sup>+</sup> et les DDC CD14<sup>+</sup> expriment différents PRR, présentent différents degrés d'activation et de maturation. Les DDC CD1a<sup>+</sup> sont plus matures que les DDC CD14<sup>+</sup> (Angel et al., 2007) et n'engendrent pas les mêmes profils de réponse immunitaire (Klechevsky et al., 2008). En effet, *in vitro* les DDC CD14<sup>+</sup> semblent induire des réponses de type T auxiliaire folliculaire « *T follicular helper* » (Tfh), qui promeuvent une différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'Ac de haute affinité dans les centres germinatifs des nœuds lymphatiques, ce qui n'est pas le cas des DDC CD1a<sup>+</sup> (Klechevsky et al., 2008). Plus récemment d'autres populations de DDC ont été identifiées chez l'homme, basées sur l'expression du CD141. Une population de DDC CD141<sup>+</sup> exprimant faiblement le CD11c, négative pour le CD14 mais positive pour le CD1c et le CD1a a été caractérisée. Les DDC CD141<sup>+</sup> excellent dans la cross-présentation, la stimulation de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Cette population produit de fortes quantités de TNF-α et CXCL10, peu d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-10 et pas d'IL-12 après stimulation par rapport aux autres DDC (Haniffa et al., 2012). Une autre population de DDC CD141<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> a également été identifiée (Haniffa et al., 2012; Chu et al., 2012). Cette dernière présente plutôt des propriétés anti-inflammatoires, de par sa capacité à produire constitutivement de l'IL-10, et participe au maintien de la tolérance. En effet Chu et ses collaborateurs ont montré sa capacité à cross-présenter les Ag du soi aux lymphocytes auto-réactifs afin d'induire leur différenciation en lymphocytes Treg (Chu et al., 2012).

Ces différentes sous-populations de DDC diffèrent donc d'un point de vue phénotypique et fonctionnel. En effet, elles montrent des capacités d'induction de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> d'intensité différentes : les DDC CD141<sup>+</sup> présentent une meilleure capacité de stimulation par rapport aux DDC CD1a<sup>+</sup>, qui elles, présentent une capacité intermédiaire, alors que

les DDC CD14<sup>+</sup> sont les moins efficaces (Klechevsky et al., 2008; Haniffa et al., 2012). De rares cellules CD1a<sup>+</sup>CD207<sup>+</sup> présentant des caractéristiques distinctes des DDC CD1a<sup>+</sup> ont été mises en évidence dans le derme chez l'homme. Différentes études ont montré que ces cellules correspondaient à des cellules de Langerhans en migration dans le derme (mLC). En effet, les mLC expriment un fort niveau de CD1a, sont CD207<sup>+</sup> et expriment CD208 (DC LAMP), une molécule surexprimée avec l'activation des DC. Les DDC CD1a<sup>+</sup> expriment quant à elles un niveau plus modéré de CD1a et n'expriment ni le CD207 ni le CD208 (Angel et al., 2007). Les mLC CD207<sup>+</sup> ont également été mises en évidence chez la souris (Henri et al., 2010)

Les populations de cellules dendritiques dermales chez la souris ont été bien caractérisées et montrent une diversité plus importante que chez l'homme. En effet Henri et ses collaborateurs ont montré l'existence d'au moins 4 populations de DDC distincts des mLC, dont deux sous-populations montrent une expression pour le CD207 (Henri et al., 2010). La présence de DDC CD207<sup>+</sup> a en effet été démontrée dans de nombreuses autres études chez la souris (Bursch et al., 2007; Ginhoux et al., 2009; Merad et al., 2008; Poulin et al., 2007; Takahara et al., 2002; Flacher et al., 2010; Nagao et al., 2009). Plus récemment une population de DDC CD301b<sup>+</sup>, a été mise en évidence chez la souris ainsi que sa capacité à induire une réponse de type Th2 (Kumamoto et al., 2013; Murakami et al., 2013; Gao et al., 2013). Les études phylogénétiques soulignent l'existence de caractères communs entre les différentes sous-populations identifiées chez la souris et chez l'homme et montrent qu'elles présentent des fonctions communes (Contreras et al., 2010; Haniffa et al., 2012). Par exemple les DDC CD141<sup>+</sup> de l'homme montrent des similarités avec les DDC CD103<sup>+</sup> de la souris, et, ces deux populations montrent une spécialisation dans la cross-présentation (Haniffa et al., 2012). Les études des populations de DC murines permettent de mieux comprendre leur fonction *in vivo* et aident à comprendre leur origine. L'utilisation de souris chimériques, parabiotiques ou encore greffées a grandement aidé à cette compréhension. L'établissement d'une correspondance entre les populations murines et humaines permet, mais avec réserve, de transposer les découvertes chez la souris chez l'homme et d'émettre des hypothèses sur la fonction et l'origine des DC humaines.

Les informations sur l'origine, le renouvellement et le maintien des différentes populations de DC ont été largement documentées par les découvertes faites chez la souris, bien que certaines de ces informations aient également été confirmées chez l'homme (Haniffa et al., 2013; Merad et al., 2013; Robbins et al., 2008). Le Flt3L « FMS like tyrosine kinase 3 Ligand » et son récepteur flt3 ont un rôle prépondérant dans la différenciation et l'homéostasie des DC (Merad et al., 2013). En effet la déficience en Flt3L ou en son récepteur engendre une diminution des DC (Ginhoux et al., 2009; Haniffa et al., 2013) alors que l'injection de flt3L induit une drastique augmentation des DC dans le

sang (Maraskovsky et al., 2000), les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (Maraskovsky et al., 1996). Le facteur de croissance GM-CSF « Granulocytes macrophages colony-stimulating factor » est également impliqué dans la différenciation et l'homéostasie des DC mais son action plus ciblée est moins évidente *in vivo* (Maraskovsky et al., 1996) et semble être principalement requise pour les DC des tissus non lymphoïdes comme la peau (Merad et al., 2013; Haniffa et al., 2013). Les différentes sous populations de DDC ont une origine hématopoïétique et dérivent d'un précurseur circulant dérivé de la moelle osseuse (Gordon and Taylor, 2005; Haniffa et al., 2009; Kennedy and Abkowitz, 1997; Merad et al., 2008, 2013) (figure 2) qui renouvelle continuellement le pool de DC. Les DDC ne sont pas radorésistantes et, lors d'expériences de greffe de moelle osseuse, elles sont plus ou moins rapidement remplacées par des cellules dérivées du greffon (Ginhoux et al., 2009). Ginhoux et son équipe suggèrent également que la discrète population humaine de DC CD141<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> du sang, négative pour le CD1c et le CD1a, soit le précurseur de la population de DDC CD141<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>. En effet ces 2 populations présentent une signature génétique proche, et les DC CD141<sup>+</sup> sanguines sont capables d'acquérir le CD1c et le CD1a au contact d'une suspension dermique (Haniffa et al., 2012).

#### d. Les monocytes/macrophages

Les macrophages résidants du derme sont une population de cellules ayant un rôle dans le maintien de l'homéostasie en condition normale en phagocytant les cellules sénescents, les débris du microenvironnement et en participant à la réparation des tissus endommagés après inflammation (Rodero and Khosrotehrani, 2010). Ils ont un rôle très important dans la lutte et la protection contre les infections de par leur capacité à phagocyter les pathogènes, à sécréter des composés toxiques et des cytokines pro-inflammatoires (Mosser and Edwards, 2008; Gordon and Taylor, 2005). Les macrophages murins produisent des dérivés azotés comme le monoxyde d'azote (NO), capable de détruire les microorganismes grâce à l'arginase et l'oxyde nitrique synthase inductible ou « *inducible nitric oxide synthase* » (iNOS). Cependant, la présence de ces deux enzymes chez l'homme est controversée (Murray and Wynn, 2011). Ils présentent une capacité de phagocytose supérieure aux DC, et sont capables de migrer (Toichi et al., 2008) ce qui est illustré par la présence de macrophages contenant des pigments dans la peau et dans les nœuds lymphatiques drainant la peau chez les individus tatoués (Zaba et al., 2007). Malgré leur capacité de migration *in vivo*, les macrophages ne migrent pas des explants de peau même après l'ajout dans le milieu de médiateurs inflammatoires et restent fixés dans le tissu dermique *ex vivo* (Haniffa et al., 2009) et n'acquièrent pas le CCR7 (Haniffa et al., 2009). Ils ne peuvent être isolés que par digestion enzymatique et dissociation mécanique du

tissu dermique (Haniffa et al., 2012; Zaba et al., 2007; Kennedy and Abkowitz, 1997; Ochoa et al., 2008).

Chez l'homme, les macrophages sont des cellules très autofluorescentes (Haniffa et al., 2009), caractérisés par l'expression de HLA-DR, de CD14, de CD68, de CD163, de CD206 et du factor XIIIa (FXIIIa) (Haniffa et al., 2009; Ochoa et al., 2008; Zaba et al., 2007). L'expression du CD11c et du CD1c, marqueurs attribués au cDC, est décrite comme faible ou négative selon les études (Haniffa et al., 2009; Ochoa et al., 2008; Zaba et al., 2007). L'expression du CD209 (DC-SIGN) par les macrophages semble dépendre du protocole utilisé pour l'étude des différentes populations du derme. Les marquages des macrophages *in situ* révèle une expression du CD209 (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008). Seulement, cette expression est perdue suite au traitement enzymatique du tissu dermique par la collagénase, traitement permettant l'étude phénotypique des cellules par cytométrie de flux (Ochoa et al., 2008). Les macrophages dermiques présentent une morphologie proche des DC et sont localisés dans le derme supérieur proche de l'épiderme, plutôt à proximité des capillaires sanguins. Ces cellules ne sont pas capables d'induire la prolifération de lymphocytes T naïfs (Zaba et al., 2007), où l'induisent de façon très faible par rapport aux DC (Haniffa et al., 2009).

Les macrophages sont une population hétérogène du point de vu de leurs phénotypes et de leurs fonctions (Mosser and Edwards, 2008). Deux grandes sous-populations de macrophages ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo*.

Les macrophages classiquement activés, également appelés Macrophages M1, interviennent généralement en condition inflammatoire (Mosser and Edwards, 2008). Ils sécrètent dans le milieu des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12..., participent à l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil cellulaire de type Th1, participent directement à l'élimination de l'agent infectieux et ont une activité anti tumorale. En effet ils ont la capacité de phagocyter directement les pathogènes ou de les détruire par des composés toxiques comme des anions superoxydes, des dérivés oxygénés et nitrogénés (Mosser and Edwards, 2008).

Les macrophages alternativement activés, également appelés Macrophages M2, correspondent aux macrophages résidants dans les tissus à l'état basal (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008; Gordon and Taylor, 2005). Ils participent au maintien de l'homéostasie et au processus de cicatrisation. Ces macrophages arborent plutôt une fonction anti-inflammatoire et participent au maintien de la tolérance en condition non inflammatoire. En cas d'infection, ils ont un rôle important contre les parasites de type helminthe (Anthony et al., 2006) et participent à l'orientation de la réponse vers un profil Th2 par le biais de leur synthèse de CCL22 et CCL17, Ligand du CCR4 (Mosser and Edwards, 2008; Gordon, 2003). Les macrophages M1 et M2 ont été relativement bien caractérisés *in vitro*, après culture de monocytes. L'ajout de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et de LPS différencie les macrophages en M1,

qui expriment le CD80, le CD86 et le CD64, alors que l'ajout d'IL-4, d'IL-13 ou d'IL-10 différencie les macrophages vers un profil M2 (Fuentes-Duculan et al., 2010; Vogel et al., 2013; Mosser and Edwards, 2008). Les M2 sont plus hétérogènes et différents profils sont obtenus en fonction des stimuli. L'IL-4 et ou l'IL-13 différencient les macrophages en M2 CD206<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> CD163<sup>-</sup>. Ces (IL-4/IL-13) M2 présentent un profil fonctionnel proche des macrophages intervenant dans le processus de cicatrisation. L'IL-10 différencie les macrophages en M2 CD206<sup>low</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD163<sup>+</sup> présentant un profil similaire aux macrophages régulateurs capables d'inhiber la réponse immune (Ambarus et al., 2012; Mosser and Edwards, 2008).

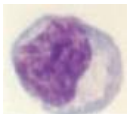


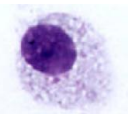


*In vivo*, la classification des macrophages est bien plus complexe. De nombreuses études montrent que des macrophages de types M2 peuvent produire des marqueurs et sécréter des molécules, associés avec les macrophages de type M1 (Fuentes-Duculan et al., 2010; Vogel et al., 2013; Zeyda et al., 2007). Les macrophages peuvent être impliqués dans les maladies auto-immunes comme le psoriasis, maladie causée par une inflammation chronique dans la peau, où il a été montré que les macrophages CD163 donc M2 étaient beaucoup plus représentés qu'en condition normale et que ces macrophages étaient classiquement activés vers un profil M1 (Fuentes-Duculan et al., 2010). Le microenvironnement semble donc jouer un rôle extrêmement important sur l'état d'activation des macrophages. Les macrophages sont donc des cellules présentant une plasticité très importante et peuvent passer d'un état d'activation à l'autre (Porcheray et al., 2005) et se trouvent *in vivo*, principalement en condition inflammatoire, à des niveaux intermédiaires d'activation (Stout et al., 2005; Stout and Suttles, 2004) ne correspondant pas nécessairement à la dichotomie M1/M2 définie *in vitro*.

Les macrophages résidants du derme dérivent en grande majorité des monocytes sanguins (Imhof and Aurrand-Lions, 2004; Haniffa et al., 2012; Gordon and Taylor, 2005). Les monocytes sont des cellules sanguines hématopoïétiques, originaires de la moelle osseuse. Ils se différencient à partir d'un précurseur commun des macrophages et des DC le MDP (Figure 4) (Haniffa et al., 2013; Merad et al., 2013). Ce sont des cellules présentant des caractéristiques relativement hétérogènes, que ce soit du point de vue de leur forme, de leur taille, de la morphologie de leur noyau, de leur degré de granulosité, et également au niveau de leurs marqueurs d'expressions (Gordon and Taylor, 2005; Grage-Griebenow et al., 2001). Chez l'homme les monocytes sont caractérisés par l'expression du CD14 et du CMH de classe II. Deux sous populations ont été identifiées en fonction de leur niveau d'expression pour le CD14 et pour le CD16 : les monocytes CD14<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup> positifs pour le CCR2 sont qualifiés de classiques ou d'inflammatoires et sont les plus abondants ; les monocytes CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> exprimant également fortement le CX3CR1 sont minoritaires et sont qualifiés de résidents (Gordon and Taylor, 2005; Grage-Griebenow et al., 2001). Ces deux sous-populations de monocytes ont été

identifiées dans différents modèles animaux comme chez la souris, et, bien que les marqueurs exprimés en fonction des espèces divergent il semble que ces deux sous-populations arborent les mêmes fonctions et certaines capacités communes (Gordon and Taylor, 2005). Les monocytes inflammatoires sont recrutés dans les tissus sièges d'une inflammation en réponse au gradient de chimiokine produit dans ces tissus. La chimiokine MCP-1 (CCL2) par exemple, attire par chimiotactisme les monocytes inflammatoires du sang, qui expriment CCR2 le récepteur du CCL2. Parvenus sur le site de l'inflammation, les monocytes inflammatoires se différencient soit en DC de type DC inflammatoires (Iijima et al., 2011; Serbina et al., 2003) capables d'activer des lymphocytes T naifs (Geissmann et al., 2003) soit en macrophages de type M1 (Imhof and Aurrand-Lions, 2004).

Les monocytes dits résidents infiltrent les tissus à l'état basal et donnent naissance aux macrophages résidents des tissus (Geissmann et al., 2003) en réponse à la production constitutive de la fraktalkine (CX3CL1) et du CCL3, chimiokines constitutivement produites par les tissus et ligands du CX3CR1 et du CCR5 respectivement, exprimés par les monocytes résidents.

Les monocytes sont donc les précurseurs directs des macrophages résidents des tissus. D'ailleurs des études montrent la présence, de monocytes non différenciés en condition basale et inflammatoire dans le tissu cutané (Tamoutounour et al., 2013; Jakubzick et al., 2013). Cependant, Les données relativement récentes de la littérature suggèrent que la majorité des populations de macrophages tissulaires se mettent en place avant la naissance et sont maintenues en condition physiologique indépendamment des monocytes circulants (Haniffa et al., 2009; Greter et al., 2012; Yona et al., 2013). De plus, les études sur le renouvellement des populations hématopoïétiques après greffe de moelle osseuse, ont montré la grande persistance des macrophages dans les tissus périphériques et leur renouvellement particulièrement lent. En effet un an après transplantation, 50% des macrophages sont encore d'origine du receveur (Kennedy and Abkowitz, 1997; Haniffa et al., 2009). Ces résultats démontrent que les macrophages tissulaires peuvent avoir plusieurs origines et que l'ontogénie des macrophages reste à approfondir.

	pDC	LC	CD1a <sup>+</sup> DDC	CD14 <sup>+</sup> DDC	CD141 <sup>high</sup> CD14 <sup>-</sup> DDC	Macrophages
						
<b>Marqueur de surface</b>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>-/low</sup> CD1a <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> BDCA2 <sup>+</sup> BDCA4 <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> BDCA1 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> Sirpα <sup>+</sup> CD11b <sup>int</sup> E- Cadherine <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> BDCA1 <sup>+</sup> EpCAM <sup>-</sup> Sirpα <sup>+</sup> CD11b <sup>high</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> BDCA1 <sup>+/-</sup> EpCAM <sup>-</sup> FXIIIa <sup>-</sup> CD163 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> HLADR <sup>+</sup> CD11c <sup>low</sup> CD1a <sup>low</sup> CD14 <sup>-</sup> BDCA1 <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>-/low</sup> CD1a <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> BDCA1 <sup>-</sup> FXIIIa <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup>
<b>Lectines</b>	CD207 <sup>-</sup>	CD207 <sup>+</sup> DC-SIGN <sup>-</sup>	CD207 <sup>-</sup> DC-SIGN <sup>-</sup>	CD207 <sup>-</sup> DC-SIGN <sup>+</sup>	CD207 <sup>-</sup>	CD207 <sup>-</sup> DC-SIGN <sup>+</sup>
<b>TLR</b>	TLR1 <sup>+</sup> TLR2 <sup>-</sup> TLR3 <sup>-</sup> TLR4 <sup>-</sup> TLR5 <sup>-/low</sup> TLR6 <sup>+</sup> TLR7 <sup>+</sup> TLR8 <sup>-</sup> TLR9 <sup>+</sup>	TLR1 <sup>+</sup> TLR2 <sup>+</sup> TLR3 <sup>low</sup> TLR4 <sup>-</sup> TLR5 <sup>-</sup> TLR6 <sup>+</sup> TLR7 <sup>-/low</sup> TLR8 <sup>-/low</sup> TLR9 <sup>-</sup>	TLR1 <sup>-/low</sup> TLR2 <sup>low</sup> TLR3 <sup>-</sup> TLR4 <sup>-/low</sup> TLR5 <sup>+</sup> TLR6 <sup>low</sup> TLR7 <sup>low</sup> TLR8 <sup>low</sup> TLR9 <sup>-/low</sup>	TLR2 <sup>++</sup> TLR1 <sup>+</sup> TLR3 <sup>low</sup> TLR4 <sup>+</sup> TLR5 <sup>+</sup> TLR6 <sup>low</sup> TLR7 <sup>low</sup> TLR8 <sup>low</sup> TLR9 <sup>-/low</sup>		TLR1 <sup>+</sup> TLR2 <sup>+</sup> TLR3 <sup>+</sup> TLR4 <sup>+</sup> TLR5 <sup>+</sup> TLR6 <sup>+</sup>
<b>Ligand TLR</b>	<b>Capacité et intensité de réponse aux ligands de TLR</b>					
<b>TLR1/2</b>		-		+		++
<b>TLR2</b>	-	+		++		++
<b>TLR2/6</b>		+		++		++
<b>TLR3</b>	-	++		++	++	++
<b>TLR4</b>	-	-/+		++	-	++
<b>TLR5</b>		-		+		
<b>TLR7</b>		-/+				
<b>TLR7/8</b>	++	-		++		++
<b>TLR9</b>	++	-		-		

**Tableau 1: Phénotype et capacité de réponse aux ligands de TLR des DC et des macrophages**

Tableau récapitulatif du phénotype principal des pDC et des APC de la peau chez l'homme. Leur niveau d'expression pour les différents TLR est indiqué ainsi que leur capacité de production de cytokines (pro-inflammatoire ou et anti-inflammatoire) face à différents ligands de TLR. (Flacher et al., 2006; Haniffa et al., 2013, 2009, 2012; Klechevsky et al., 2008; Matthews et al., 2012; Merad et al., 2013; Renn et al., 2006; van der Aar et al., 2007)



## 2. Les lymphocytes de la peau

La peau humaine, en condition basale, contient deux fois plus de lymphocytes que le sang (Clark et al., 2006), leur nombre a été estimé à  $1.10^6/\text{cm}^2$ . La grande majorité des lymphocytes est localisée dans le derme papillaire, à proximité des vaisseaux sanguins et des appendices de la peau (Clark et al., 2006; Seneschal et al., 2012; Nestle et al., 2009). Des cellules T sont également présentes dans l'épiderme, en général proche des LC (Nestle et al., 2009; Seneschal et al., 2012), et présentent une morphologie de cellules dendritiques avec des dendrites enchâssées entre les kératinocytes, comme le montrent les travaux de Chodaczek et ses collaborateurs chez la souris (Chodaczek et al., 2012). Les lymphocytes T dans les tissus périphériques et notamment dans la peau ont un rôle important dans l'immunosurveillance, le maintien de l'homéostasie et de la tolérance et sont prêts à réagir en cas d'infection (Nestle et al., 2009). Les lymphocytes T de la peau humaine sont une population hétérogène mais sont en grande partie des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  mémoires exprimant un TCR de type  $\alpha\beta$  (Nestle et al., 2009), au contraire de la souris, qui abrite dans la peau plutôt des lymphocytes T de type  $\gamma\delta$  (Chodaczek et al., 2012). Chez l'homme, les lymphocytes T de la peau expriment un phénotype particulier leur permettant d'être adressé au tissu cutané. Effectivement le lieu où les lymphocytes sont activés et les facteurs environnementaux influencent leur adressage. Par exemple l'activation des lymphocytes T dans les nœuds lymphatiques drainant la peau, induit leur migration majoritairement vers la peau, alors que les lymphocytes activés dans les nœuds lymphatiques mésentériques sont adressés plutôt au tissu intestinal (Sigmundsdottir and Butcher, 2008). Les lymphocytes de la peau expriment la molécule « *cutaneous lymphocytes antigen* » (CLA), marqueur d'adressage au tissu cutané qui interagit avec la molécule d'adhésion E-sélectine, riche dans la peau. Le CCR4, également exprimé par les lymphocytes cutanés, interagit avec le CCL17 et le CCL22 produits au niveau des capillaires de la peau (Duhon et al., 2009; Sigmundsdottir and Butcher, 2008; Kupper and Fuhlbrigge, 2004; Seneschal et al., 2012; Clark et al., 2006). Des sous populations exprimant le CCR6 et le CCR8 ont également été identifiées (Clark et al., 2006). Les facteurs environnementaux ont également un rôle dans l'adressage des lymphocytes. Les rayonnements UV par exemple induisent la production de Vitamine D3. Cette vitamine se trouve donc en forte concentration au niveau de la peau. La vitamine D3, une fois métabolisée par deux enzymes possédées entre autre par les cellules B, les kératinocytes, les macrophages et les DC, se retrouve sous sa forme active, la  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  (Sigmundsdottir and Butcher, 2008). La  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  induit la production du CCR10 par les lymphocytes T, récepteur du CCL27, chimiokine spécifiquement produite par les kératinocytes (Sigmundsdottir et al., 2007; Baeke et al., 2010). Les lymphocytes T arrivant au niveau de la peau, peuvent donc acquérir le CCR10, grâce à la présence en concentration

suffisante dans les tissus cutanés de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D3, et ainsi migrer dans l'épiderme (Sigmundsdottir and Butcher, 2008).

Les lymphocytes cutanés sont en grande majorité des cellules mémoires qui ne prolifèrent pas et ne produisent pas d'IL-2, d'IL-15 ou d'IL-17 en condition basale mais expriment le CD69 et le CD25, témoignant d'un phénotype activé. Après stimulation les cellules T engendrent principalement des réponses de type Th1 (exprimant CXCR3 et CCR5) avec une plus faible proportion de réponse Th2 (exprimant CCR3 et CCR4) et montrent la présence d'une petite population de lymphocytes T régulateurs, CD25<sup>high</sup> mais CD69<sup>-</sup>, capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD25<sup>low</sup> (Clark et al., 2006). Une population de Th17 a également été mise en évidence dans la peau humaine. Cette population produit de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-22 et du TNF- $\alpha$ . Elle est caractérisée par l'expression de ROR $\gamma$ t et de CCR6. Cette population serait associée à la pathogénicité des maladies inflammatoires et auto-immunes (Yssel and Bensussan, 2010). Plus récemment, une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> proche mais distincte des Th17 a été identifiée. Cette population, appelée Th22, exprime CCR10, CCR4 et CCR6, produit d'importantes quantités d'IL-22 mais ni d'IL-17 ni d'IFN- $\gamma$  et n'exprime pas ROR $\gamma$ t. L'IL-6 et le TNF- $\alpha$  ainsi que la Vitamine D3 contribuent à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th22 et il semble que les pDC soient plus efficaces que les cDC dans l'induction de cette population (Duhon et al., 2009; Yssel and Bensussan, 2010). Chez l'homme, il est décrit que les lymphocytes cutanés peuvent recirculer entre le sang et la peau (Ferran et al., 2013; Clark et al., 2006). Mais ils semblent que certaines populations notamment les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires résidant de la peau ne recirculent pas après s'être accumulés dans le tissu cutané comme le montre les travaux de l'équipe de Kupper chez la souris (Jiang et al., 2012)

Les lymphocytes spécifiques pour un Ag s'accumulent dans la peau au niveau du site d'infection, de vaccination, de lésion, mais également à des sites distants donc dans tout le tissu cutané (Jiang et al., 2012). Ces résultats sont en accord avec la richesse des répertoires TCR dans la peau humaine (Clark et al., 2006). Les lymphocytes mémoires de spécificités différentes s'accumulent au cours de la vie au niveau de la peau. De plus il a été montré que les lymphocytes mémoires résidants dans la peau sont bien plus efficaces que les mémoires circulants pour protéger contre une épreuve par voie cutanée avec un pathogène à tropisme cutané ou des cellules tumorales (Jiang et al., 2012; Liu et al., 2010). Les lymphocytes résidants de la peau ont donc un rôle primordial dans la réponse immunitaire et dans la protection de l'hôte. Des dysfonctionnements du système immunitaire, induits par des traitements immunosuppresseurs ou des immunodéficiences, engendrent des désordres cutanés comme des maladies inflammatoires auto-immunes telles que le psoriasis ou encore certaines

formes de dermatites où les lymphocytes jouent un rôle prépondérant (Kupper and Fuhlbrigge, 2004).

### 3. Les granulocytes ou cellules polynucléaires

Les cellules polynucléaires (PMN) sont des cellules à noyaux polylobés présentant un aspect granuleux, dû à la présence dans la cellule de granules remplis de médiateurs chimiques et enzymatiques, ce qui leur vaut également le nom de granulocytes. Il existe trois sous populations de PMN, Les polynucléaires éosinophiles représentent 2 à 4 % des leucocytes sanguins chez l'homme. Ils interviennent principalement dans les réactions allergiques et dans la lutte contre les parasites. Les polynucléaires basophiles représentent entre 0,5 et 1% des leucocytes et sont également impliqués dans les réactions allergiques. Les polynucléaires neutrophiles sont les plus abondants, ils représentent 60 à 70% des leucocytes et sont très impliqués dans la lutte contre les infections bactériennes, virales et dans les processus inflammatoires en général (Nathan, 2006).

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur un site inflammatoire de par leur très bonne capacité à répondre aux signaux chimiotactiques (Chakravarti et al., 2007). Une blessure ou une infection entraîne la synthèse par les cellules des tissus lésés de cytokines et chimiokines comme IL-8, LTB<sub>4</sub>... qui attirent et activent les neutrophiles. Sous l'action de ces médiateurs, les neutrophiles acquièrent la capacité de rouler sur l'endothélium vasculaire, se fixent aux molécules d'adhésion surexprimées en cas d'inflammation et migrent à travers l'endothélium dans les tissus (Dumas and Pouliot, 2009). Le neutrophile exprime un panel varié de PRR lui permettant de reconnaître la nature de l'infection ou du traumatisme cellulaire, et ainsi de s'activer en fonction de la situation. En condition inflammatoire, le neutrophile sécrète des cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ...), des chimiokines (IL-8, CCL3 5MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ )...), des médiateurs lipidiques (TXA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>...), des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF), qui agissent sur le neutrophile lui-même en action autocrine, recrutent et activent les autres cellules inflammatoires (Dumas and Pouliot, 2009). Longtemps considéré comme une simple cellule phagocytaire possédant une activité cytotoxique non spécifique, le neutrophile se révèle être extrêmement important dans l'immunité innée et adaptative. Il participe à l'activation des macrophages et des DC, contribuant ainsi à l'orientation de la réponse immunitaire (Chakravarti et al., 2007; Nathan, 2006). Certaines études ont également suggéré la capacité du polynucléaire à capturer certains Ag dans la peau et à les transporter dans les nœuds lymphatiques (Abadie et al., 2005) ou dans la moelle osseuse (Duffy et al., 2012) pour distribuer l'Ag au APC. Le neutrophile est caractérisé chez l'homme par l'expression du CD66 et l'absence d'expression pour

HLA-DR. Ce n'est donc pas une APC. Pourtant les travaux de Oehler et ses collaborateurs ont montré que dans certaines conditions de culture *in vitro*, les neutrophiles pouvaient acquérir toutes les caractéristiques des DC et présenter très efficacement l'Ag aux lymphocytes T (Oehler et al., 1998).

Le rôle principal du neutrophile est de détruire les pathogènes. Pour cela il possède un arsenal très efficace. Il excelle dans la phagocytose, qui peut être facilitée par l'expression de récepteur Fc (RFc), lui permettant de dégrader les agents infectieux après les avoir ingérés. Il dégranule ses composés toxiques et déverse des dérivés oxygénés lors de son explosion oxydative (Dumas and Pouliot, 2009). Il est également capable de projeter son matériel génétique dans le milieu extracellulaire pour emprisonner d'éventuelles bactéries dans une sorte de toile d'araignée. Ce mécanisme est nommé « *Neutrophil extracellular Traps* » (NET) (Dumas and Pouliot, 2009). Les composés toxiques du neutrophile sont délétères pour le pathogène mais également pour les tissus de l'hôte, c'est pourquoi l'activation et le recrutement des neutrophiles sont extrêmement régulés et que les premiers mécanismes anti-inflammatoires commencent entre 24 et 48h (Dumas and Pouliot, 2009; Nathan, 2006).

#### 4. Les kératinocytes

Les kératinocytes, assurent plusieurs fonctions dont, la cohésion de l'épiderme (Prost-Squarcioni, 2006; Brandner et al., 2002) et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de par leur grande capacité à produire des cytokines en réponse à un signal de danger (Gröne, 2002). Les kératinocytes se répartissent en 4 couches : la couche basale, la couche spinieuse, la couche granuleuse et la couche cornée (figure 2). Ils se différencient de la couche basale vers l'extérieur pour former au final une couche de cellules mortes anucléées, les cornéocytes riches en kératine (Démarchez, 2011). Cette couche cornée est semi-perméable et permet de protéger l'organisme contre la déshydratation. La cohésion de l'épiderme est due à la présence de desmosomes, d'hémidesmosomes et de jonctions serrées entre les cellules qui garantissent la résistance et l'ancrage de l'épiderme dans le derme (Morita et al., 2011; Démarchez, 2011).

Les kératinocytes ont un rôle de sentinelle dans la peau car ils expriment une assez grande variété de PRR et sont capables de produire des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens en réponse à l'activation de ces PRR. Bien que n'appartenant pas stricto sensu au système immunitaire, les kératinocytes ont un rôle essentiel dans la reconnaissance des pathogènes et dans l'initiation de la réponse immune. Ils expriment en surface les TLR1, 2, 4, 5, 6 (Nestle et al., 2009; Lebre et al.,

2007). En intracellulaire, sur les endosomes, ils expriment le TLR3 (Kalali et al., 2008) et le TLR9 (Lebre et al., 2007). L'expression du TLR7 est inductible par l'activation de la voie du TLR3 (Kalali et al., 2008). Ce panel d'expression des TLR leur permet de reconnaître bon nombre de composés bactériens ainsi que les agents viraux. D'autres molécules intracellulaires de la réponse antivirale sont également exprimées par les kératinocytes et capables de détecter les ARN double brin comme le RIG-I ou la protéine kinase R (PKR) (Kalali et al., 2008). En réponse à l'activation des TLR, les kératinocytes induisent de façon prédominante une production de cytokines de type Th1 (Lebre et al., 2007) et des IFN de type I (Nestle et al., 2009). À la suite d'un traumatisme, d'une exposition aux UV ou à d'autres cytokines, les kératinocytes produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Koch et al., 2006; Gutowska-Owsiak and Ogg, 2012), mais aussi d'autres types de cytokines comme l'IL-6, IL-18, IL-10, IL-12, IL-15, IL-20... (Nestle et al., 2009; Gröne, 2002). Certaines de ces cytokines sont produites de façon constitutives et d'autres en réponse à un stimulus (Gröne, 2002). En condition inflammatoire, ils participent au recrutement de monocytes, de neutrophiles, de lymphocytes et autres cellules immunitaires (Miller and Modlin, 2007; Conrad et al., 2009). En effet ils produisent MCP1 (CCL2) et RANTES (CCL5) qui recrutent les monocytes. Ils peuvent produire d'importantes quantités de CXCL8 (IL-8) qui recrute les neutrophiles (Nestle et al., 2009; Gröne, 2002). Le CCL20 exprimé par les kératinocytes induit également le recrutement de DC immatures et de cellules de Langerhans qui expriment CCR6 (Koch et al., 2006). Par ailleurs, les kératinocytes produisent le LL37, petit peptide antimicrobien, qui active les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et induit la sécrétion d'IFN de type I (Conrad et al., 2009). Les kératinocytes interviennent dans l'orientation de la réponse immune car ils produisent des cytokines et des chimiokines différentes en réponse à des stimuli différents (Lebre et al., 2007). Par exemple, en réponse à l'activation du TLR3 et du TLR5, ils produisent CCL27, une chimiokine exclusivement produite par les kératinocytes, interagissant avec CCR10, et intervenant dans le recrutement de lymphocytes T mémoires (Miller and Modlin, 2007). La stimulation par le TLR3 et le TLR9 induit la production de CXCL9 et CXCL10 (Lebre et al., 2007), qui sont associés à l'induction d'une réponse de type Th1 et activent les lymphocytes T mémoires. L'activation des TLR3 et 9 induit également la production d'IFN de type I, molécules importantes dans la réponse antivirale (Miller and Modlin, 2007). Les kératinocytes activés peuvent exprimer le CMH de classe II après stimulation bien qu'ils ne soient pas des APC (Lebre et al., 2007). Ils expriment également beaucoup de récepteurs aux chimiokines et aux cytokines, comme, par exemple l'IL-4 et l'IL-6 qui induisent leur prolifération (Gröne, 2002).

Par conséquent, les kératinocytes sont extrêmement importants dans la protection physique contre le milieu extérieur et dans l'établissement du microenvironnement nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire (Gutowska-Owsiak and Ogg, 2012).

#### IV- Les Nœuds lymphatiques drainant la peau

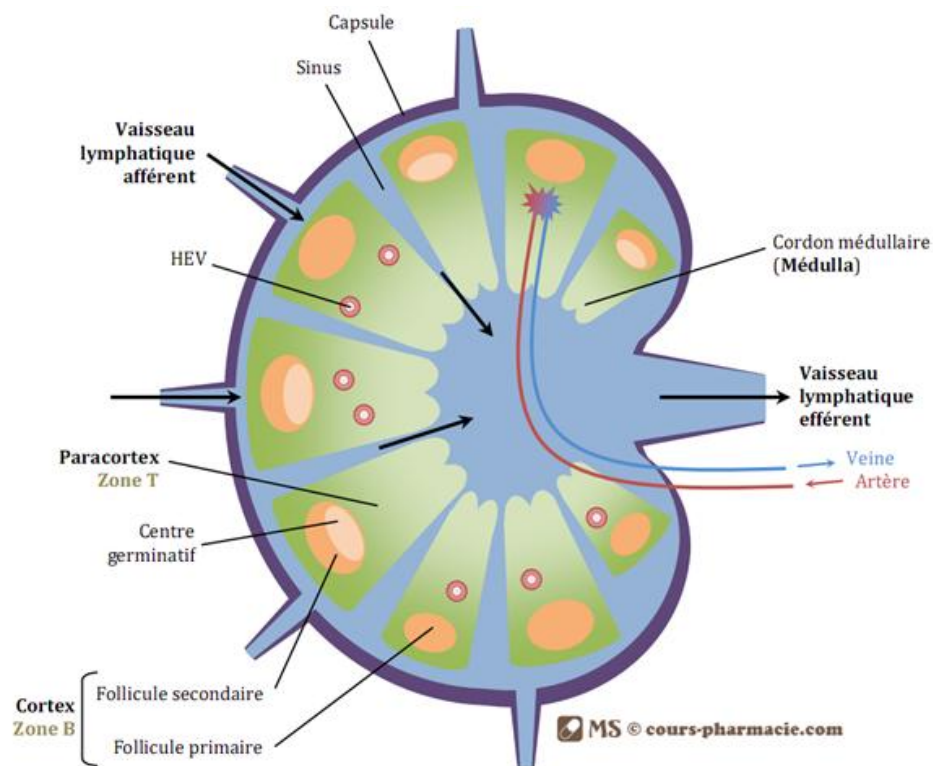
La réponse adaptative se met en place dans les organes lymphoïdes tels que les NL drainant la peau, composés en très grande majorité de lymphocytes T et B et en moins grand nombre d'APC. Les NL sont le lieu de l'activation et de la prolifération des lymphocytes. Ils se divisent en deux zones principales : le cortex et la médulla. Le cortex est divisé en zone à lymphocytes T qui constitue le paracortex et en zone à lymphocytes B qui s'organisent en follicules. Les follicules B peuvent être primaires dans lesquelles il n'y a pas de réponses immunitaires ou secondaires, dans lesquelles s'activent, se différencient et se multiplient les lymphocytes B suite à la reconnaissance d'un Ag (Butcher and Picker, 1996; von Andrian and Mempel, 2003). La médulla, zone la plus interne, contient principalement des macrophages et des cellules mémoires (von Andrian and Mempel, 2003) (Figure 5).

La lymphe apporte les cellules dans les NL via les vaisseaux lymphatiques afférents. Ces cellules se déversent dans le NL à travers les sinus, entrent en contact avec les lymphocytes et ressortent via le canal lymphatique efférent. D'autres cellules arrivent par voie sanguine via les veinules à endothélium épais (HEV) comme les lymphocytes (Butcher and Picker, 1996; Marchesi and Gowans, 1964) et les DC résidentes qui se localisent majoritairement dans les zones paracorticales (von Andrian and Mempel, 2003) ou encore les monocytes en cas d'inflammation (Palframan et al., 2001) (Figure 5).

Les APC dans les NL sont isolées du reste des cellules grâce à leur non-expression des marqueurs lymphoïdes tels que CD3, CD20, CD8 et leur expression du CMH de classe II (Malleret et al., 2008; Brown et al., 2007). Les pDC  $CD11c^-CD1c^-CD123^+$  représentent moins de 0.04% de la totalité des cellules mononuclées du NL et les cDC  $CD11c^+CD1c^+CD123^{lo/-}$  moins de 0.03% (Malleret et al., 2008; Brown et al., 2007). On distingue deux groupes de DC dans les NL, les DC dites résidentes qui s'établissent dans les NL par voie sanguine, et les DC migrantes qui arrivent par voie lymphatique et apportent les Ag des tissus périphériques (von Andrian and Mempel, 2003; Merad et al., 2013). L'Ag peut être transporté dans les NL après sa capture au niveau de la peau par une APC, puis, migration

de celle-ci dans les NL (Kumamoto et al., 2013). Il peut également arriver dans les NL par drainage passif par les canaux lymphatiques.

Dans les tissus périphériques les DC sont à un stade immature, dans les NL les DC résidentes sont elles aussi à un stade plutôt immature tandis que les DC migrantes sont à un stade mature (Haniffa et al., 2012; Merad et al., 2013). La distinction entre les DC résidentes et les DC migrantes est possible grâce à leur différents niveaux d'expression du CD11c et du CMH de classe II. En effet les cDC résidentes sont  $CD11c^{high}CMHII^{+}$  et les cDC migrantes sont  $CD11c^{+}CMHII^{high}$  (Ohl et al., 2004; Haniffa et al., 2012). De plus, chez l'homme les cellules  $CD1a^{+}$  dans les NL témoignent de leur origine cutanée et l'expression du CD207 suggère que ce sont des LC (Geissmann et al., 2002). Dans les NL on retrouve continuellement des LC qui migrent en condition normale de la peau vers les NL (Ohl et al., 2004) et qui ont alors principalement un rôle dans le maintien de la tolérance (Shklovskaya et al., 2011). Dans les NL, en condition inflammatoire, la quantité de LC ainsi que les autres populations de DC de la peau augmentent (Ohl et al., 2004), contribuant ainsi à une induction de la réponse immunitaire (Ouchi et al., 2011).



**Figure 5: représentation schématique d'un nœud lymphatique drainant.**

Les cellules issues des tissus périphériques arrivent via les canaux afférents, travers le NL via les sinus et entre en contact avec les lymphocytes.

(<http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoides.html>)

## **C- La vaccination et les besoins en stratégies innovantes**

### **I- Les stratégies de vaccination**

#### **1. Stratégies classiques**

La vaccination consiste à stimuler le système immunitaire contre un Ag afin que l'organisme développe une réponse immunitaire spécifique et qu'il en garde une mémoire à long terme. En cas de rencontre avec l'agent infectieux d'intérêt, la réponse spécifique se réactive rapidement et permet le contrôle de l'infection avant l'apparition des symptômes liés à la maladie. Les stratégies de vaccination utilisant des vaccins vivants dont la virulence des agents pathogènes a été atténuée sans perte de leur pouvoir immunogène se révèlent particulièrement efficaces (Ambrose et al., 2008; Gaucher et al., 2008; Theiler and Smith, 1937; Zheng et al., 2012). Cependant, ces vaccins posent des problèmes d'innocuité dus au caractère vivant des vaccins et des risques potentiels de retour à la virulence (Pasteur et al., 1881). Les vaccins inactivés présentent une meilleure innocuité mais sont généralement moins immunogènes. Les vaccins sous-particulaires présentent également un bon profil d'innocuité mais sont faiblement immunogènes et nécessitent souvent l'ajout d'adjuvant (Perrie et al., 2008). Ces stratégies classiques de vaccinations sont efficaces et ont permis de protéger les populations contre un important nombre de maladies infectieuses. Cependant, pour des maladies infectieuses comme le SIDA ou le paludisme, qui sont deux des maladies infectieuses les plus mortelles au monde, ces stratégies sont inefficaces. Le vaccin antituberculeux utilisé actuellement n'est pas non plus satisfaisant en terme de protection et de contrôle de la pandémie (Ottenhoff, 2009). Pour ces maladies complexes il est nécessaire d'élaborer de nouvelles stratégies de vaccination plus efficaces afin d'induire les réponses immunitaires adéquates et protectrices.

Les recherches en « vaccinologie » ont aujourd'hui deux objectifs principaux :

- 1) mettre au point de nouveaux vaccins contre des maladies dangereuses pour la santé publique
- 2) améliorer l'innocuité et l'efficacité des vaccins existants.

#### **2. Les nouveaux vaccins**

Les progrès en biologie moléculaire ont permis l'élaboration de vaccins plus contrôlés reposant sur le génie génétique, ce sont les vaccins recombinants. Ces vaccins permettent d'améliorer les stratégies vaccinales existantes (Kao and Chen, 2002), d'élaborer de nouveaux vaccins et candidats vaccins pour



lutter contre les maladies infectieuses où la vaccination par les méthodes actuelles s'est révélée peu efficace, voire totalement inefficace (Eloit M., 1998; Plotkin, 2005). Le génie génétique permet d'élaborer des vaccins qui ne contiennent que des souséléments de l'agent pathogène comme une protéine (Kao and Chen, 2002). Certaines de ces protéines ont des propriétés d'auto-assemblage pour mimer une capside virale mais sans matériel génétique : les « virus like particles » ou VLP (Abdoli et al., 2013; Kemp et al., 2011).

L'atténuation des souches vaccinales par génie génétique, ciblée sur des sites clairement identifiés, est reproductible (Moiré et al., 2009; Eloit M., 1998), ce qui n'est pas le cas de l'atténuation empirique (Eloit M., 1998; Theiler and Smith, 1937). Cependant ces vaccins vivants atténués recombinants présentent toujours des risques non négligeables. Une atténuation insuffisante est effectivement toujours envisageable et redoutée (Baba et al., 1999). Inversement, une atténuation trop importante stimule plus faiblement le système immunitaire (Johnson et al., 1999). C'est pourquoi, ces stratégies de vaccination ne sont pas recommandées chez les personnes immunodéprimées, les jeunes enfants et les personnes âgées (Ambrose et al., 2008; Eloit M., 1998). La réplication des souches peut être totalement abolie pour garantir une meilleure innocuité, mais la perte de pouvoir immunogène est souvent très significative (Shiver et al., 2002; Lambe, 2012).

Certaines de ces souches recombinantes comme des souches d'adénovirus, la modification du virus de la vaccine de la souche Ankara (MVA) sont souvent utilisées comme vecteur pour délivrer des Ag d'autres agents infectieux (Casimiro et al., 2003a; Rollier et al., 2011; Hirao et al., 2010; Hansen et al., 2013). Ceci permet donc de conserver l'avantage des vaccins vivants qui induisent de fortes réponses immunes mais de s'affranchir des problèmes d'innocuité causé par l'utilisation de la souche pathogène vivante elle-même (Baba et al., 1999). Cependant l'utilisation de souches recombinantes induit une réponse immune contre le vecteur. Cette réponse peut aboutir à la neutralisation du vecteur lors des rappels de vaccination. De plus, l'existence d'une immunité pré-existante résultant d'une infection naturelle par un virus utilisé en tant que vecteur est fréquemment un facteur diminuant son immunogénicité (Casimiro et al., 2003a; Saxena et al., 2013). C'est en particulier le cas des adénovirus, notamment de sérotype 5. L'utilisation de vecteurs n'engendrant pas ce genre d'inconvénient, comme les plasmides d'expression, présente donc, de ce point de vue, un réel avantage.

## II- Les vaccins ADN

Les vaccins ADN font partie d'une nouvelle génération de vaccins faisant appel au génie génétique. Ils permettent d'insérer des gènes d'intérêt dans un plasmide, sous la dépendance d'un promoteur favorisant l'expression du gène codant l'Ag vaccinal et, éventuellement d'immuno-stimulants, chez l'hôte vacciné.

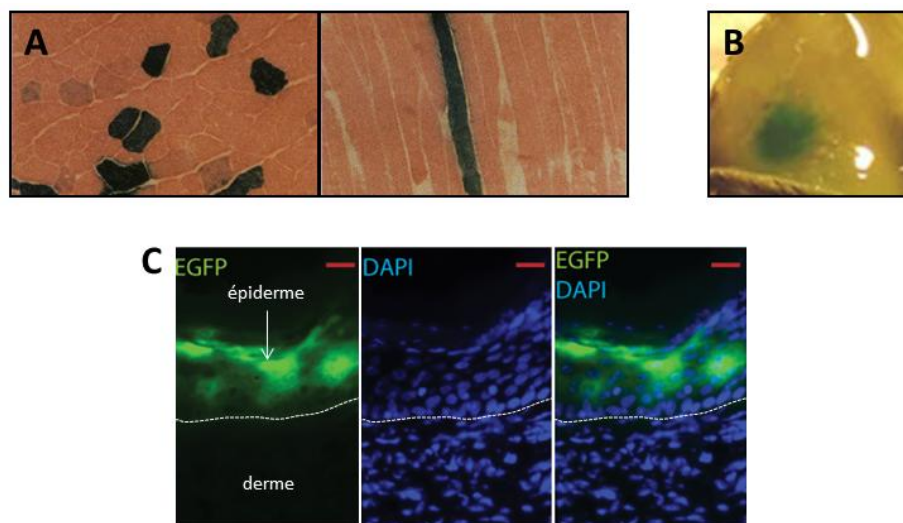
### 1. Principe et intérêt

Dans les années 1990, les essais de thérapie génique ont montré qu'une injection intramusculaire d'un plasmide « nu » codant un gène rapporteur entraînait la synthèse *in vivo* de la protéine (Figure 6), parfois pendant plusieurs dizaines de jours (Wolff et al., 1990). D'autres études ont par la suite montré la persistance de la synthèse d'Ag pendant une longue période parfois jusqu'à 22 semaines post injection (Danko et al., 1997). Ces expériences de transfection *in vivo* ont apporté la preuve qu'un acide nucléique ADN ou ARN avait la capacité d'induire une production de protéines par les cellules transfectées directement *in vivo* et d'induire une réponse immune contre celle-ci (Martinon et al., 1993; Fu et al., 1997; Tang et al., 1992). Comme lors d'une infection virale naturelle, les cellules transfectées produisent elles-mêmes l'Ag vaccinal, permettant la synthèse des protéines dans la bonne conformation et correctement glycosylées reproduisant ainsi parfaitement les épitopes antigéniques natifs des protéines du pathogène (Kaiserlian and Etchart, 1999), ce qui est souvent difficile à obtenir par synthèse peptidique *in vitro*. Les vaccins à base d'acides nucléiques disposeraient donc, en théorie, des avantages des vaccins vivants atténués (Ferraro et al., 2011), qui, comme nous l'avons vu précédemment induisent une bonne réponse immunitaire humorale et cellulaire. En revanche, les plasmides n'induisent pas d'immunité contre la structure du vecteur (MacGregor et al., 1998), au contraire des vecteurs vivants (Saxena et al., 2013). La réponse immune obtenue suite à une immunisation est donc dirigée uniquement contre les protéines vaccinales, laissant la possibilité de faire un nombre indéfini de rappels de vaccination (Hirao et al., 2010).

La vaccination par ADN plasmidique est la stratégie la plus couramment utilisée. Elle est basée sur la transfection *in vivo* des cellules hôtes avec un plasmide d'origine bactérienne codant un ou plusieurs Ag d'intérêts pouvant s'exprimer dans les cellules transfectées. Les séquences d'intérêt sont insérées par génie génétique dans un plasmide bactérien et mises sous le contrôle d'un promoteur viral, le plus souvent le CMV, promoteur permettant l'expression du transgène dans tous les types cellulaires (Kaiserlian and Etchart, 1999; Saroja et al., 2011). Ces séquences codantes sont suivies de séquences de polyadénylation/terminaison de la transcription nécessaire à la bonne traduction de l'ARNm,

permettant ainsi une forte expression des Ag vaccinaux dans les cellules de mammifères (Kaiserlian and Etchart, 1999). Généralement, Le vecteur ADN contient une origine de réplication procaryote permettant d'obtenir de grande quantité de plasmide après transfection de celui-ci dans un système d'expression généralement bactérien, ainsi qu'un gène de résistance aux antibiotiques souvent nécessaire au protocole de sélection des bactéries transformées. Enfin l'ADN est une structure stable et peu fragile permettant sa bonne conservation. Les caractéristiques ADN de ce type de vaccin rendent cette stratégie intéressante pour la vaccination à grande échelle car le vaccin serait peu couteux, stable, facile à produire et obtenu rapidement (Kodihalli et al., 1999; Kaiserlian and Etchart, 1999).

Le vaccin ADN peut être administré sous 3 formes, ADN nu en solution saline, ADN fixé sur particules d'or ou ADN encapsulé dans un vecteur inerte (Kaiserlian and Etchart, 1999). Le vecteur nucléaire est non infectieux, incapable de se répliquer dans les cellules eucaryotes ou de s'intégrer dans le génome des cellules hôtes ou alors son potentiel d'intégration reste bien en dessous de la fréquence de mutation naturelle spontanée (Bråve et al., 2010; Martin et al., 1999; van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010). Il reste donc sous forme épisomale dans le noyau ou dans le cytoplasme des cellules transfectées (Kaiserlian and Etchart, 1999).



**Figure 6: expression de l'Ag vaccinal dans les tissus.**

L'injection de plasmide codant la  $\beta$ -galactosidase permet la mise en évidence de la synthèse d'Ag in vivo grâce à l'ajout ex-vivo de X-Gal. Le produit de l'hydrolyse du X-Gal par la  $\beta$ -Gal est visible en bleu, dans les fibres musculaires après injection im (Wolff et al., 1990) (A) ou dans la peau après injection i.d +EP (Roos et al., 2009) (B). L'injection i.d d'un plasmide codant la eGFP permet la mise en évidence de la synthèse d'Ag dans l'épiderme après injection i.d (d'après González-González et al., 2011)(C).

## 2. Efficacité chez le petit animal de laboratoire

Les premiers essais vaccinaux utilisant un acide nucléique comme vecteur montrèrent des résultats très encourageants chez le petit animal de laboratoire, aussi bien au niveau de la quantité de protéines vaccinales produites que de la réponse immune obtenue suite à l'immunisation et de sa capacité à protéger les animaux lors d'une épreuve utilisant le pathogène correspondant (Donnelly et al., 1997). En 1992 Tang et son équipe montrent que l'immunisation avec un plasmide fixé sur microparticule d'or dans la peau induit une réponse humorale chez la souris et que cette réponse peut être amplifiée par un rappel de vaccination avec la même construction (Tang et al., 1992). De plus l'administration chez la souris par voie im, la voie la plus communément utilisée en vaccination, d'un acide nucléique codant un Ag permet d'obtenir une très bonne production de ce dernier (Wolff et al., 1990). L'ARN permet d'obtenir environ 10 fois plus de protéines que l'ADN mais l'ADN permet une production beaucoup plus durable dans le temps. La présence de certaines protéines transfectées après injection d'ADN peut être détectée pendant au moins 60 jours après immunisation (Wolff et al., 1990). Or la persistance de l'Ag dans l'organisme ainsi que sa quantité (Korver et al., 1987) a un impact direct sur l'intensité de la réponse immune induite. Il a été montré dans plusieurs études que l'immunisation avec un vecteur plasmidique permettait d'induire les deux composantes de l'immunité avec une réponse humorale et cellulaire spécifique (Cardoso et al., 1996; Ulmer et al., 1993; Donnelly et al., 1997) et qu'une unique injection est efficace pour induire une forte immunité (Cardoso et al., 1996). Kodihalli et son équipe ont montré dans un modèle d'infection par le virus influenza chez la souris que l'immunité induite après immunisation par bombardement d'ADN fixé sur microparticule d'or (*gene gun*) était capable de totalement endiguer la réplication virale après épreuve virale homologue et permettait de limiter puis d'éradiquer l'infection virale lors d'une épreuve virale hétérologue (Kodihalli et al., 1999). Ils mettent également en lumière l'aptitude de la vaccination ADN à induire une réponse mémoire protectrice notamment humorale avec une réactivation des lymphocyte B mémoires juste après épreuve virale chez les animaux préalablement vaccinés (Kodihalli et al., 1999; Ulmer et al., 1993). Les travaux d'Ulmer montrent quant à eux toujours dans un modèle d'influenza chez la souris que la réponse humorale induite était capable de neutraliser les souches homologues et que la réponse cellulaire de type CTL permettait une protection plus large contre des variants hétérologues (Ulmer et al., 1993). Ces résultats confirment l'intérêt de la vaccination ADN pour induire une protection large contre des pathogènes comme l'influenza, le VIH ou encore le paludisme caractérisés par d'importantes variétés antigéniques. La vaccination ADN s'est révélée efficace dans un bon nombre de modèles précliniques comme les modèles d'influenza chez la souris, le furet ou encore le poulet (Donnelly et al., 1997; Fynan et al., 1993; Kodihalli et al., 1999; Ulmer et al., 1993), mais a également montré sa capacité à induire une

réponse immunitaire efficace contre des agents pathogènes variés, viraux, bactériens et parasitaires dans différents modèles de rongeurs (Kaiserlian and Etchart, 1999; Donnelly et al., 1997).

Ces très bons résultats obtenus chez le petit animal de laboratoire ont donné beaucoup d'espoirs pour la vaccination ADN chez l'homme. Celle-ci permettrait d'avoir des vaccins contre de multiples pathogènes faciles et rapides à produire, reproduisant les avantages des vaccins vivants, ceux plus particulièrement pour les pathogènes viraux, et qui garantiraient une parfaite innocuité, faisant de la vaccination ADN une stratégie de vaccination parfaite ou presque.

### 3. Efficacité chez les gros animaux de laboratoire et premiers essais chez l'homme

Malgré les très bons résultats obtenus dans les modèles murins, l'immunogénicité des premières générations de vaccins ADN dans des modèles animaux plus imposants, comme le poulet, le primate non humain et chez l'homme, s'est révélé être plutôt décevante (Hutnick et al., 2011; Fynan et al., 1993).

En effet, Fynan et son équipe ont testé un vaccin ADN contre le virus influenza dans le modèle souris et dans le modèle poulet: une réponse immune était obtenue dans les deux modèles mais elle était plus faible et moins efficace pour protéger lors d'une épreuve létale dans le modèle poulet. En effet après immunisation intramusculaire, le vaccin ADN permet une protection de 95% après une épreuve létale dans le modèle souris alors que ce taux de protection descend à 30% dans le modèle poulet (Fynan et al., 1993). Également dans le modèle primate, la vaccination par de l'ADN induit une réponse immunitaire mais celle-ci est bien inférieure à celle obtenue après vaccination par le vecteur viral adénovirus 5 (Casimiro et al., 2003a). L'induction d'une réponse immunitaire chez l'homme semble requérir plusieurs injections et une forte dose d'ADN (Graham et al., 2006), au contraire de ce qui avait été constaté chez la souris où une seule immunisation induisait une bonne réponse immunitaire (Cardoso et al., 1996). Les réponses humorales et cellulaires sont en général modestes suite à la vaccination par de l'ADN, certains individus sont même non répondeurs (Graham et al., 2006; Wang, 1998). Ces réponses obtenues chez l'homme sont probablement trop faibles pour induire une protection efficace. Chez des personnes séropositives pour le VIH, ne prenant pas de traitement antirétroviral, un essai de vaccination thérapeutique s'est révélé incapable d'augmenter de façon franche la réponse immunitaire contre le VIH et aucune diminution de la charge virale n'a pu être observée (MacGregor et al., 1998).

La vaccination ADN reste tout de même une stratégie intéressante, particulièrement en raison de sa très bonne innocuité et de sa capacité à stimuler l'immunité humorale et cellulaire. C'est pourquoi malgré les premiers résultats peu encourageants obtenus dans des modèles animaux non rongeurs et chez l'homme de nouvelles méthodes pour augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN ont été envisagées. De plus, il est important de noter que la plupart des études de vaccination par de l'ADN nu ont montré un effet dose (Rizzuto et al., 1999). La quantité de vecteur nucléaire est donc essentielle pour l'obtention d'une bonne réponse immunitaire. Par comparaison, les modèles murins sont souvent vaccinés avec des doses très importantes de vaccin, de 100 à 200µg compte tenu de la taille de l'animal (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010; Flynn et al., 2005; Cardoso et al., 1996). Les doses administrées chez l'homme sont, proportionnellement, bien plus faibles (30µg à 8mg) (Casimiro et al., 2003a; Graham et al., 2006; MacGregor et al., 1998; Wang, 1998). Cette différence de quantité par rapport au poids de l'individu vacciné pourrait expliquer la plus faible immunogénicité des vaccins ADN chez des animaux plus imposants que la souris et chez l'homme (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010).

#### 4. Stratégie permettant d'optimiser l'efficacité des vaccins ADN

##### a. Adjuvants

##### i. Traditionnels

L'ADN nu chez le gros animal et chez l'homme est peu immunogène mais il peut être adjuvanté comme n'importe quel autre vaccin. De plus, l'origine bactérienne du vecteur plasmidique apporte un avantage intéressant pour la vaccination. En effet la présence de motifs CpG, séquences d'acides nucléiques non méthylées, typique des ADN bactériens, permet de stimuler l'immunité innée via le TLR9 (Tudor et al., 2005; Liu, 2010). Cette reconnaissance induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kaiserlian and Etchart, 1999; Liu et al., 2006), apportant ainsi au vecteur un effet adjuvant. De façon surprenante toutefois, des études ont également démontré que le plasmide bactérien augmentait la réponse immunitaire de façon indépendante de la voie de signalisation du TLR9 (Babiuk et al., 2004b; Spies et al., 2003). Les mécanismes d'action des ADN bactériens sur l'activation du système immunitaire restent donc encore à approfondir.

Des adjuvants comme des ligands de TLR (Ligands TLR 7, 8, 5...), les classiques sels d'aluminium (Alum) ou encore des copolymères non ioniques peuvent être ajoutés à la formulation du vaccin ADN et ils sont capables d'augmenter la réponse immune obtenue en comparaison à celle obtenue avec un ADN nu (Casimiro et al., 2003a; Ulmer et al., 2006).

## ii. Adjuvants cytokines et chimiokines

L'ajout dans un vecteur plasmidique vaccinal ou dans un vecteur plasmidique additionnel de séquences codant des adjuvants moléculaires de type cytokine et chimiokine permettent d'augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN (Hutnick et al., 2011). Ces adjuvants étant produits en même temps que l'Ag vaccinal, ils permettent d'accroître et d'orienter la réponse immune. Ainsi plusieurs études ont montré que l'ajout d'IL-2, d'IFN- $\gamma$ , d'IL-12 (Jalah et al., 2012; Su et al., 2012), d'IL-7, d'IL-6, d'IL-15 (Su et al., 2012) de GM-CSF, d'IL-4 ... augmente l'immunité aussi bien humorale que cellulaire induite par les vaccins ADN (Hutnick et al., 2011). La synthèse de chimiokine permet aussi de modifier l'adressage de la réponse immunitaire, comme de potentialiser la domiciliation des cellules vers les muqueuses, lieu d'entrée d'un grand nombre de pathogènes. Par exemple dans le cas d'une vaccination contre le VIH, l'ajout d'une séquence codant la chimiokine CCL27 permet d'augmenter l'adressage des cellules vers les muqueuses chez la souris et le PNH (Kraynyak et al., 2010; Hutnick et al., 2011).

## b. Système de délivrance

Le problème de la faible immunogénicité des vaccins ADN est en partie dû au fait qu'ils ne sont pas infectieux et que la transfection des cellules par de l'ADN nu n'est pas un mécanisme actif au contraire des vecteurs viraux. Cette transfection n'est donc que peu efficace et la quantité d'Ag produite est plutôt faible (Ulmer et al., 2006) et requiert des quantités d'ADN relativement importantes (Graham et al., 2006). Néanmoins un certain nombre de méthodes ont été développées pour optimiser à la fois la transfection des cellules et l'expression de l'Ag vaccinal.

## i. Système de délivrance sans aiguille

### Pistolet à gène ou « Gene gun »

La stratégie du « gene gun » est une méthode d'administration du vaccin ADN sans aiguille. Elle consiste à fixer l'ADN sur des microparticules généralement d'or et à les propulser dans la peau grâce à un gaz à haute pression, le plus souvent l'hélium. Les microparticules pénètrent directement dans les cellules de la peau sans distinction et sans les tuer, transfectant ainsi APC et non-APC (Hutnick et al., 2011; Condon et al., 1996). Cette méthode a montré sa très bonne efficacité (Saroja et al., 2011) et demande des quantités d'ADN 100 à 1000 fois moins importantes que lors d'une injection pour

obtenir une réponse immunitaire intense (Tang et al., 1992; Fynan et al., 1993; Kodihalli et al., 1999; Hutnick et al., 2011).

#### Injection par jet ou « *jet injector* »

L'injection par jet est une forme d'administration sans aiguille. Le vaccin ADN formulé sous forme liquide est délivré à travers la peau, le tissu sous-cutané voir le tissu musculaire par propulsion du vaccin par un gaz à haute pression (Saroja et al., 2011; Walther et al., 2008; Bråve et al., 2010) (Figure 7). Cette méthode induit une inflammation locale due à la pénétration de liquide dans les couches profonde de la peau et peut endommager les vaisseaux sanguins ce qui peut entraîner des hématomes (Kis et al., 2012).

#### Système de patches à microaiguilles

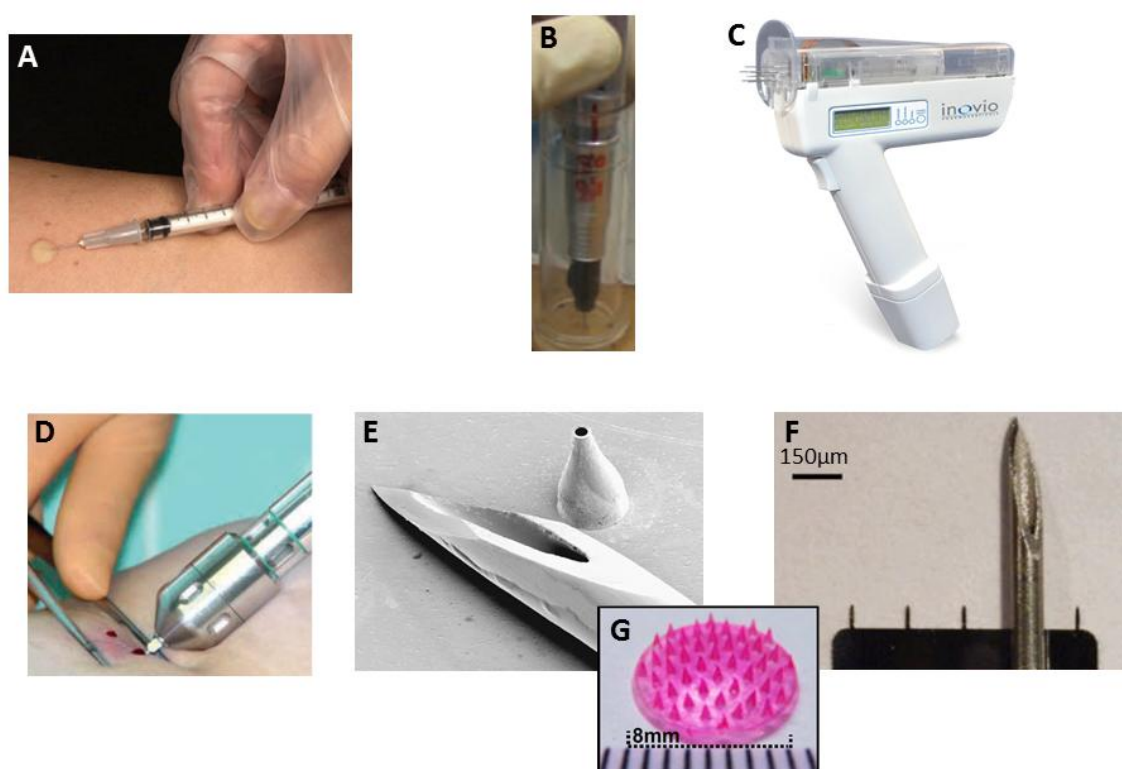
De nouvelles méthodes de délivrance des vaccins ADN sans aiguilles ont également montré leurs efficacité comme les patches à micro-aiguilles capables de délivrer l'ADN efficacement dans les cellules de l'épiderme et du derme et permet d'induire une réponse immunitaire (Saroja et al., 2011; Bachy et al., 2013; DeMuth et al., 2013). Il existe divers systèmes de patches à microaiguilles autant dans la composition des aiguilles, que dans leur forme (Figure 7). Les matériaux utilisés peuvent être des polymères biodégradables ou des matériaux non dégradables comme le verre, l'acier inoxydable... (Kis et al., 2012) L'ADN est incorporé dans les microaiguilles (Bachy et al., 2013) ou fixé à leur surface (Kim et al., 2014; DeMuth et al., 2013) pour être délivré dans la peau lors de l'application. L'avantage majeur des systèmes à microaiguilles est que l'administration est simple et sans douleur. Ce système permet d'induire une meilleure quantité d'Ag synthétisé qu'une injection sous cutanée et induit une réponse immunitaire plus intense à dose équivalente que l'injection sc (Kim et al., 2014) ou im malgré des doses vaccinales plus faibles comparées à celle utilisées en im (Song et al., 2012). Cette méthode est également plus performante pour générer une réponse protectrice par comparaison à la voie d'injection im (Song et al., 2012). Ces différents systèmes permettent de s'abolir de la nécessité d'une injection et permettent de délivrer l'ADN vaccinal dans les tissus et les cellules de façon plus efficace que lors d'une administration classique par injection.

#### *ii. tatouage ADN*

Les systèmes utilisant des courtes aiguilles de l'ordre de 1 mm oscillant à haute fréquence, généralement utilisés pour les tatouages peuvent également être utilisés pour l'administration des vaccins ADN dans la peau (Kis et al., 2012; van den Berg et al., 2009) (Figure 7). Ce système présente



l'avantage majeur de pouvoir délivrer le vaccin ADN dans une large surface cutanée pour potentiellement transfecter un nombre de cellules plus important (Kis et al., 2012). Les cellules transfectées sont en grande majorité des kératinocytes avec quelques rare LC, cependant l'efficacité de transfection reste relativement faible (van den Berg et al., 2009). Néanmoins, cette méthode de vaccination ADN s'avère efficace dans l'induction d'une robuste réponse immunitaire (Pokorna et al., 2008; Verstrepen et al., 2008; Kis et al., 2012). En effet, la vaccination par tatouage ADN sans adjuvant induit une réponse immunitaire cellulaire et humorale supérieure à celle obtenue par voie im (Verstrepen et al., 2008) même en cas d'ajout d'adjuvant (Pokorna et al., 2008). Ce procédé n'engendre pas d'effet néfaste important pour les individus mais induit une inflammation locale qui se résout en quelques jours (Verstrepen et al., 2008). Néanmoins le processus vaccinal est relativement douloureux (Kis et al., 2012).



**Figure 7: Système de délivrance des vaccins ADN.**

Injection intradermique par la méthode Mantoux (Kis et al., 2012)(A). Système d'injection intradermique par tatouage « DNA tatooing » (van den Berg et al., 2009) (B). Système d'injection et d'électroporation intramusculaire ([www.inovia.com](http://www.inovia.com)) (C). Système d'injection sans aiguille par jet de liquide à haute pression « jet injector » (Walther et al., 2008) (D). Comparaison entre la taille classique des aiguilles utilisées par les injection hypodermique et les nouveaux système de microaiguille solide (Kis et al., 2012) (E et F). Système de patch à microaiguille fabriqué en matière biodégradable se dissolvant après application dans la peau (G) (Bachy et al., 2013).

*iii. Vecteur inerte*

Utiliser des vecteurs inerts comme des microparticules, de polymères biodégradables, ou des lipides cationiques qui peuvent fixer l'ADN grâce à sa charge négative, permet d'optimiser la transfection des cellules (Denis-Mize et al., 2000) et de protéger le vaccin nucléique. La taille des microparticules de 1 à 3  $\mu\text{m}$  est propice à la phagocytose, augmentant la transfection des cellules phagocytaires comme les APC, plutôt que les autres types cellulaires comme les myocytes (Liu, 2010; Denis-Mize et al., 2003).

*iv. Électroporation*

L'électroporation (EP) est une méthode ayant fait ses preuves pour augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN (Ferraro et al., 2011; Rosati et al., 2008; Martinon et al., 2009), jusqu'à dans certains cas, être aussi efficace voire plus performante que les vaccins viraux vectorisés (Hirao et al., 2010; Casimiro et al., 2003a). Après injection de l'ADN nu, un champ électrique est délivré à travers le site d'injection grâce à des électrodes. Ce signal électrique induit une instabilité temporaire des membranes avec une ouverture des pores cellulaires permettant l'augmentation de la capture par les cellules de macromolécules comme l'ADN (Hutnick et al., 2011; Wang et al., 2004). De nombreux modèles précliniques ont montré que l'EP pouvait entraîner de légers dommages tissulaires mais que ces dommages n'étaient que temporaires et se résolvaient rapidement (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010; Rizzuto et al., 1999) démontrant ainsi l'innocuité de cette méthode. L'EP induit également des mécanismes impliqués dans la réponse immune innée indépendamment de la présence de l'ADN. En effet le stress cellulaire et les légers dommages tissulaires engendrés par l'EP induisent une production de cytokines et chimiokines (Roos et al., 2009; Grønevik et al., 2005) qui contribuent à l'augmentation de la réponse immune adaptative (Chen et al., 2011).

Une question se pose également sur le potentiel de l'EP à augmenter l'intégration de l'ADN dans le génome des cellules transfectées. Certaines études ont montré que l'EP n'avait pas de conséquence sur l'intégration du vecteur ADN dans le génome de la cellule hôte (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010; Bråve et al., 2010) ou qu'elle pouvait l'augmenter mais en restant toujours en dessous de la fréquence de mutation naturelle (Wang et al., 2004).

L'EP peut être intramusculaire ou intradermique. Les électrodes se présentent soit sous forme plane soit sous forme d'aiguilles pour les EP im (Figure 7). Les électrodes planes permettent une électroporation intramusculaire ou intradermique à travers la surface de la peau, elles permettent

une EP moins invasive et moins douloureuse (Zhang et al., 2002; Grønevik et al., 2005). Le protocole d'EP est important et influence l'efficacité de la transfection et par conséquent de la réponse immune induite (Zhao et al., 2006). Plusieurs paramètres interviennent lors d'une EP : le voltage, le nombre de pulses électriques ainsi que le temps de chaque pulse, la polarité du courant électrique, l'ampérage, la résistance de la peau. Il s'avère que la polarité du courant n'a finalement que peu d'impact sur l'efficacité de transfection comme le nombre de pulses. Un pulse semble suffisant pour drastiquement augmenter la transfection et par conséquent la synthèse du transgène (Zhang et al., 2002). De nombreuses études démontrent l'efficacité de l'EP pour drastiquement augmenter l'immunogénicité des vaccins et ce avec des quantités réduites d'Ag par rapport aux injections sans EP (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010). Il semble également que l'EP influence la qualité de la réponse immune adaptative avec une augmentation des lymphocytes centraux et effecteurs mémoires spécifiques de l'Ag (Rosati et al., 2008).

#### c. Optimisation du vecteur ADN

Une stratégie alternative pour augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN est de mimer l'infection naturelle des cellules en utilisant des plasmides codant des réplicons viraux qui stimulent l'immunité. Les réplicons codent toutes les enzymes virales requises pour la réplication des ARN viraux. Ces réplicons permettent de produire un haut niveau d'Ag. Les vaccins à ADN additionnés de réplicons stimulent l'immunité à des doses plus faibles que les vaccins ADN conventionnels suggérant qu'ils ont des propriétés adjuvantes (Liu et al., 2006). Ces effets adjuvants sont potentiellement dus à la capacité de l'ARN double brin réplcatif à stimuler l'immunité antivirale dans les cellules transfectées. Cependant les plasmides avec réplicons sont de taille très importante ce qui rend la transfection des cellules plus difficile (Liu, 2010).

Des modifications du vecteur plasmidique lui-même peuvent induire une augmentation de l'efficacité des vaccins ADN. Par exemple l'efficacité du promoteur peut être augmentée, des séquences leader alternatives peuvent être utilisées, les codons du pathogène peuvent être remplacés par ceux utilisés par les mammifères... (Wang et al., 2006; Ulmer et al., 2006). Des séquences codantes permettant directement ou indirectement d'augmenter la quantité de protéines vaccinales produites peuvent être ajoutées au plasmide vaccinal. Par exemple l'équipe de Krohn a montré que l'ajout d'une protéine virale permettait de fixer le plasmide aux chromosomes lors des divisions cellulaires, permettant ainsi une conservation de ce dernier dans le noyau cellulaire bien plus efficace que la même construction plasmidique mais sans cette protéine virale (Blazevic et al., 2006).

## d. Stratégie de prime-boost

La vaccination par « prime boost » est une stratégie innovante consistant à utiliser des vaccins différents dans un même schéma vaccinal (Rerks-Ngarm, 2009; Thera and Plowe, 2012; Moorthy et al., 2004). Cette stratégie permet de stimuler efficacement la composante humorale et cellulaire de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un même Ag en utilisant un vaccin plus apte à induire une réponse de type cellulaire et un vaccin plus apte à induire la composante humorale. Les vaccins ADN ont l'avantage de ne pas induire de réponse immune contre le vecteur nucléique (MacGregor et al., 1998). Leur utilisation en prime-boost est donc une stratégie particulièrement intéressante pour induire une puissante réponse humorale et cellulaire potentiellement protectrice. Une vaccination primaire ou « prime » avec un vecteur viral induit une réponse contre tous les composants du vaccin, vecteur et Ag vaccinal. Le boost subséquent avec un vaccin ADN ne permet pas une amplification suffisante de la protéine vaccinale. Le schéma inverse, un prime avec un vaccin ADN initie et focalise la réponse immunitaire contre les protéines vaccinales d'intérêt et le « boost » subséquent avec un vecteur viral amplifie cette réponse de façon efficace (Hutnick et al., 2011). Un prime avec un vaccin ADN suivi d'un boost avec un vecteur viral est une des stratégies les plus efficaces pour l'induction d'une forte réponse cellulaire (Hutnick et al., 2011; Létourneau et al., 2007; Casimiro et al., 2003a). C'est pourquoi ce schéma vaccinal est retenu dans la plupart des essais vaccinaux impliquant un vaccin ADN (Hutnick et al., 2011; Ferraro et al., 2011).

Ces différentes méthodes ont permis d'améliorer l'efficacité de la vaccination ADN. Le tableau 2 illustre quelques essais cliniques impliquant un vaccin ADN.

<b>Candidat vaccin ADN</b> Phase Réf sur <i>clinicaltrial.gov</i>	<b>Maladie ciblée</b> Code la/les Ag	<b>Voie d'administration</b> Type de vaccin	<b>Initiation de l'essai</b> sponsor
<b>Xenogeneic Tyrosinase DNA vaccine</b> Phase I NCT00471133	<b>Mélanome</b> épitopes de la tyrosinase murine	<b>I.M+EP</b> Thérapeutique	<b>2007</b> Ichor Medical systemes incorporated
<b>VRC-FLUDNA063-00-VP</b> Phase I NCT01676402	<b>Grippe saisonnière</b> protéine HA	<b>I.M</b> <b>I.D</b> Prophylactique	<b>2012</b> NIAID
<b>GTU®-multiHIV B clade</b> Phase I NCT02075983	<b>VIH</b> Polypeptide Rev, Nef, p17, p24, épitopes CTL	<b>I.M+EP</b> <b>I.M+TC</b> <b>I.M+I.D</b> Prophylactique	<b>2013</b> Imperial College London
<b>VGX-3100</b> Phase I NCT00685412	<b>HPV16 et 18</b> E6 et E7	<b>I.M+EP</b> Thérapeutique	<b>2008</b> Inovio Pharmaceuticals
<b>ADVAX</b> Phase I	<b>HIV-1</b> Gag, Env, Pol, Nef, Tat	<b>I.M</b> <b>I.M+EP</b>	<b>2007</b> Rockefeller University

NCT00545987		Prophylactique	
<b>tetwtCEA ± GM-CSF</b> Phase I/II NCT01064375	<b>Cancer colorectal</b> protéine de fusion : CEA - épitopes toxine tétanique	<b>I.D+EP</b> <b>I.D+EP + GM-CSF</b> Thérapeutique	2009 Maria Liljefors
<b>EP-1300</b> Phase I NCT01169077	<b>paludisme</b> Protéine polyépitopique du P.falciparum	<b>IM+EP</b> Prophylactique	2010 NIAID
<b>pVAXrcPSAv53I</b> phase I/II NCT00859729	<b>Cancer de la prostate</b> PSA du macaque rhésus	<b>I.D +EP</b> Thérapeutique	2009 Uppsala University
vaccin ADN: <b>GTU-</b> <b>multiHIV<sub>8</sub></b> vaccin lipopetidique : <b>LIPO-5</b> phase II NCT01492985	<b>HIV</b> “prime” :vaccin ADN Polypeptide Rev Nef p17 p24 épitopes CTL “boost” : vaccin lipopetide Gag, Nef	<b>IM</b> Thérapeutique	2011 Inserm-ANRS
<b>CHRONVAC-C®</b> Phase I/II NCT00563173	<b>Virus hépatite C</b> NS3/4A	<b>IM + EP</b> Thérapeutique	2007 Tripep AB
<b>ppdpSC18</b> phase I NCT00277576	<b>Virus hépatite B</b> Ag du VHB	<b>PMED</b> Thérapeutique	2006 PowderMed

Tableau 2: exemples d'essais cliniques impliquant un candidat vaccin ADN.

## 5. Le rôle des cellules transfectées

Les mécanismes impliqués dans la vaccination ADN sont peu connus et controversés (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010). Après vaccination ADN par voie im, la protéine vaccinale est détectable dans le sang dès deux jours post immunisation chez la souris montrant que l'Ag vaccinal est synthétisé et relégué dans la circulation sanguine (Chattergoon et al., 1998). Les myocytes sont les principales cellules transfectées suite à une vaccination im (Danko et al., 1997). Cependant les myocytes sont des cellules somatiques incapables d'induire la stimulation de lymphocytes T naïf. Bien que certains travaux suggèrent l'implication d'APC directement transfectées dans l'induction de la réponse immunitaire après leur migration dans les NL (Chattergoon et al., 1998), la vaccination ADN par voie im impliquerait majoritairement les myocytes comme réservoir d'Ag pour les APC recrutées au niveau du site d'injection. Néanmoins, l'ablation très précoce, moins de 10 min après vaccination, du site d'injection n'a pas d'impact sur l'intensité de la réponse immune (Torres et al., 1997). Ces résultats surprenants démontrent que les cellules musculaires ne sont pas une source d'Ag indispensable et que l'ADN vaccinal transfecte d'autres cellules lors d'une vaccination par voie im.

Lors d'une vaccination par voie i.d, il a été démontré que les protéines vaccinales s'exprimaient dans les kératinocytes, dans les fibroblastes et dans les DC. Les kératinocytes sont des cellules avec un renouvellement rapide, la production d'Ag vaccinale semble donc moins durable que dans le derme (Raz et al., 1994). La vaccination par « *gene gun* » induit quant à elle principalement la transfection des kératinocytes. Bien que la vaccination par voie cutanée transduise principalement les cellules somatiques, une certaine proportion d'APC se trouve également transfectée (Akbari et al., 1999; Condon et al., 1996; Corr et al., 1999). Plusieurs études montrent la présence de DC directement transfectées par le plasmide vaccinale dans les NL mais pas dans la rate ce qui montre que ces cellules migrent dans le NL après immunisation et sont capables de synthétiser l'Ag. Toutefois, la contribution des APC directement transfectées dans l'induction de la réponse immune est controversée (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010). Certaines études démontrent le rôle essentiel des APC directement transfectées dans l'induction de la réponse immunitaire (Porgador and Irvine, 1998; Condon et al., 1996), tandis que d'autres ont démontré l'importance du transfert d'Ag des kératinocytes aux DC (Akbari et al., 1999) et de la cross-présentation (Corr et al., 1999) dans l'induction de la réponse immunitaire plutôt que la présentation directe de l'Ag par les DC directement transfectées. Ces derniers travaux mettent en lumière le rôle essentiel des cellules non-APC comme source d'Ag pour les DC. De plus, l'équipe de Robinson a démontré que l'ablation précoce du site d'injection après immunisation par « *gene gun* » avant 1 à 2 jours après vaccination réduit drastiquement l'intensité de la réponse immune induite (Torres et al., 1997) démontrant l'importance des cellules de la peau comme source d'Ag.

Il semble donc que la voie d'immunisation implique des mécanismes différents dans l'induction d'une réponse immunitaire.

## OBJECTIFS

Les mécanismes immunologiques impliqués dans les réponses vaccinales sont largement méconnus. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'améliorer les vaccins existants et d'élaborer de nouvelles stratégies vaccinales notamment contre des maladies infectieuses pour lesquelles il n'existe à ce jour pas de vaccin efficace.

La mise en place d'une réponse vaccinale semble être précocement déterminée par la communication entre les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Les interactions cellulaires et moléculaires semblent influencer l'orientation, l'intensité, la persistance et l'efficacité de la réponse immune. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) ont un rôle central dans l'induction de la réponse immunitaire et sont riches dans la peau. La peau est donc un organe de choix pour l'administration de vaccins et pour l'étude des mécanismes immunologiques liés à la vaccination.

Nous proposons d'étudier les interactions cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire précocement mise en place au niveau du site d'injection d'un vaccin chez le primate non humain. Cette étude a pour objectif principal de mieux comprendre certains des mécanismes précoces de la réponse vaccinale.

Le premier objectif a consisté en l'identification des populations de cellules immunitaires de la peau du macaque cynomolgus par la méthode très sensible de cytométrie en flux.

Le second objectif de ce travail de thèse a consisté en l'étude de la réponse immunitaire précoce mise en place dans la peau suite à l'injection par voie intradermique du vaccin de type ADN « auxo-GTU » administré en association à une électroporation locale. Nous avons cherché à mettre en évidence l'impact de la présence du vaccin ADN et de l'EP sur les populations cellulaires résidentes et recrutées au niveau du site d'injection et d'établir la cinétique de la réponse immunitaire innée induite.

Le troisième objectif a consisté en l'identification d'une ou plusieurs populations d'APC prenant en charge l'Ag vaccinal au niveau de la peau et le présentant dans les NL.

Le résultat attendu de cette étude était de déterminer les mécanismes précoces responsables de l'induction de la réponse immunitaire adaptative notamment en identifiant les cellules impliquées dans le processus vaccinal au niveau de la peau et du NL et plus spécifiquement dans la présentation de l'Ag vaccinale.

# APPROCHES EXPERIMENTALES

## A- Le choix du modèle animal

### I- Pertinence du modèle animal

Les modèles animaux représentent un outil indispensable à la compréhension des mécanismes immunologiques sollicités lors d'une infection, d'une vaccination, d'un cancer, d'une maladie auto-immune, (Meurens et al., 2012). Un bon modèle animal partage les mêmes caractéristiques physiologiques que l'homme ou au moins les reflète le plus fidèlement possible (Gerdtts et al., 2007).

Les différences entre la souris et l'homme font que les résultats d'un protocole de vaccination chez la souris sont rarement prédictifs des résultats obtenus chez l'homme (Davis, 2008). Ceci est, par exemple, illustré par la différence d'efficacité des vaccins ADN chez la souris et chez l'homme (Gerdtts et al., 2007).

Le cochon domestique est un modèle utilisé pour l'étude de plusieurs maladies infectieuses. Il est proche de l'homme au niveau anatomique, génétique et physiologique et les expériences réalisées avec ce modèle sont bien plus prédictives au niveau de l'efficacité d'un traitement thérapeutique que les expériences réalisées chez la souris. D'un point de vue immunologique, la plupart des protéines du système immunitaire montrent des similarités structurales et fonctionnelles avec leur équivalent humain. De plus, le système immunitaire porcin présente plus de 80% de similarités avec celui de l'homme (Meurens et al., 2012). Le modèle porcin est très intéressant surtout au niveau des études de peau (Meurens et al., 2012; Schmook et al., 2001; Gerdtts et al., 2007). En effet, au contraire de la peau de rongeurs, la peau de cochon présente une densité, un aspect microscopique, des ultra-structures et une composition similaires à la peau humaine (Meurens et al., 2012; Hammond et al., 2000).

### II- Le macaque

Les primates non humains (PNH), de par leurs similarités génomiques, physiologiques et immunologiques avec l'homme constituent un ensemble de modèles attrayants pour l'étude d'une large variété de maladies infectieuses, comme la tuberculose, la malaria ou encore le VIH (Gardner and Luciw, 2008; Hu, 2005; Kaushal et al., 2012; Louz et al., 2013). La ressemblance au niveau biologique entre l'homme et les PNH permet de reproduire chez les PNH les aspects clés de la



maladie de l'homme. Les modèles PNH ont significativement contribué à la compréhension de la pathologie du SIDA incluant les études sur le virus, les thérapies antivirales, la prévention de la transmission et le développement de vaccins (Hatzioannou and Evans, 2012).

Les macaques représentent l'espèce de PNH la plus utilisée en médecine expérimentale. Il existe plus de vingt espèces de macaques dont les plus utilisées sont le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) et le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (Louz et al., 2013). Vingt-cinq millions d'années d'évolution séparent l'homme et le macaque. Par conséquent, ils sont génétiquement proches (Yan et al., 2011). Le macaque est considéré comme particulièrement pertinent pour de nombreuses maladies infectieuses de l'homme comme la tuberculose, la grippe, les gastrites et cancers dus à *Helicobacter pylori* ou encore la poliomyélite (Gardner and Luciw, 2008). Mais c'est dans l'étude du VIH que le macaque est le plus utilisé (Hatzioannou and Evans, 2012). En effet, bien qu'il ne s'infecte pas avec le VIH, il est susceptible à l'infection par le SIVmac (*simien immunodeficient virus of macaque*) ou virus de l'immunodéficience simienne infectant le macaque. Le SIVmac montre une forte proximité avec le HIV-2 et avec le SIVsm des mangabeys enfumés (Hirsch et al., 1989; Chakrabarti et al., 1987). L'infection des macaques cynomolgus par le SIVmac induit une infection chronique aboutissant à un SIDA similaire à celui observé chez l'homme (Gardner and Luciw, 2008; Karlsson et al., 2007). Le modèle macaque d'infection par le SIV a permis de démontrer l'importance du tractus gastrointestinal dans l'infection aigue comme site de réplication du SIV et de déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>. Les maladies opportunistes et les tumeurs associées à la phase SIDA de l'homme sont quasiment identiques chez le macaque (Gardner and Luciw, 2008). Ce modèle est donc de choix pour l'étude de la réponse immunitaire (Briel et al., 2014) et le test de potentiels candidats vaccins notamment anti-HIV ou SIV. De plus, les populations cellulaires et l'expression des marqueurs sur ces populations sont similaires à l'homme. Les outils de caractérisation, comme les anticorps monoclonaux, développés chez l'homme cross-réagissent pour une grande part avec les molécules correspondantes chez le macaque. Par ailleurs, ces dernières années, de plus en plus de réactifs immunologiques spécifiques des PNH ont été développés (Louz et al., 2013), facilitant grandement l'utilisation du macaque.

## B- Le choix du modèle vaccinal

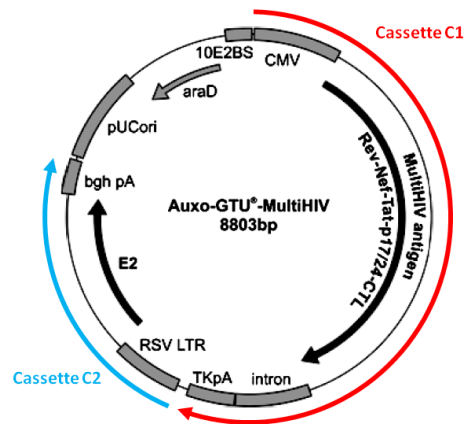
### I- Le vaccin ADN anti-VIH auxo-GTUmultiHIV<sub>B</sub>

Plus de trente années après la découverte du VIH, un vaccin efficace n'est toujours pas disponible. Vesna Blazevic et son équipe, au sein de l'entreprise FITBiotec ont élaboré un candidat vaccin anti-VIH innovant contenant plusieurs antigènes du VIH-1 afin d'induire une protection à large spectre contre les différentes souches du VIH-1 de clade B (Blazevic et al., 2006). Ils ont opté pour un vaccin de type ADN qui, garantit de très bons critères d'innocuité, avec l'impossibilité de provoquer une infection et la possibilité d'induire principalement des réponses de type cellulaire (Letvin, 2002). Pour faire face à la faible immunogénicité des vaccins ADN dans les modèles de « gros animaux » et chez l'homme, différentes stratégies pour optimiser les vecteurs nucléiques ont été utilisées lors de la construction du vaccin (Blazevic et al., 2006). De même, le protocole vaccinal a été optimisé par différentes équipes (Blazevic et al., 2006; Bråve et al., 2009; Krohn et al., 2005; Martinon et al., 2009; Mölder et al., 2009; Malm et al., 2011).

#### 1. Les vecteurs nucléiques GTU et auxo-GTU

Les plasmides d'unité de transport de gènes (GTU) « *Gene Transport Unit* », sont des plasmides bactériens synthétiques contenant une origine de réplication procaryote permettant la propagation du plasmide dans le système d'expression *E. coli*. Ils contiennent également un gène de résistance à la kanamycine, antibiotique permettant la sélection des clones bactériens positifs pour le plasmide d'intérêt lors du protocole de fabrication du vaccin ADN. Ces plasmides contiennent 2 cassettes d'expression distinctes. La première cassette [C1] code la protéine d'intérêt : vaccinale, gène rapporteur..., la deuxième [C2] contient une séquence codante participant à l'optimisation du plasmide (Figure 8) (Blazevic et al., 2006; Krohn et al., 2005).

Les plasmides auxo-GTU (Figure 8) sont dérivés des plasmides GTU mais sont plus adaptés à la vaccination chez l'homme car le gène de résistance à la kanamycine a été remplacé par le gène *araD*, pour éviter les problèmes d'une éventuelle propagation d'un gène de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Les plasmides auxo-GTU sont produits dans une souche *E. coli* déficiente pour le gène *araD* cultivée dans un milieu avec de l'arginose comme source de carbone. Seules les bactéries transfectées par le plasmide auxo-GTU ont la capacité de métaboliser l'arginose, et donc de se multiplier. La technologie auxo-GTU permet ainsi une production du plasmide vaccinal sans antibiotique, stable, par un procédé de fermentation à grande échelle (Krohn et al., 2005).



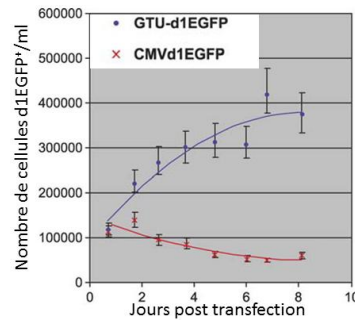
**Figure 8 : plasmide vaccinal auxo-GTU® multiHIV<sub>B</sub>**

Les plasmides de type auxoGTU possèdent deux cassettes d'expression. La cassette C1 code le gène d'intérêt et la cassette C2 code la protéine E2 du BPV-1, d'après Martinon 2009.

La cassette C1 contient la séquence codant la protéine d'intérêt, placé sous le contrôle du promoteur viral du cytomegalovirus (CMV) qui permet une forte transcription dans tous les types cellulaires. Une séquence leader ainsi que des séquences introniques et des séquences de polyadénylation ont été ajoutées pour permettre une transcription et une traduction optimale du gène d'intérêt. La protéine d'intérêt est alors produite en grande quantité et est localisée dans le cytoplasme des cellules transfectées (Krohn et al., 2005; Blazevic et al., 2006).

Certains virus ont développé des stratégies pour que leur génome reste associé aux chromosomes de leur cellule hôte, afin d'être répartie dans le génome des cellules filles sans être perdu dans le cytoplasme lors des divisions cellulaires. La protéine E2 codée par les papillomavirus a la capacité de se lier par sa partie N-terminale à la chromatine mitotique (Abroi et al., 2004) et par sa partie C-terminale à des séquences nucléotidiques de type ACCG.CGGT appelées site d'attachement de la protéine E2 (E2-BS) « E2 binding site » (Djuranovic et al., 2004) riches dans le génome viral. La propriété de cette protéine a été exploitée pour optimiser le plasmide vaccinal. La cassette d'expression C2 code la protéine E2 du papillomavirus bovin (BPV-1), dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur LTR 5' du virus du sarcome de Rous (RSV LTR). Dix séquences consécutives E2-BS (10E2BS), ont été ajoutées dans le plasmide vaccinal (Blazevic et al., 2006; Krohn et al., 2005). Lors des divisions cellulaires des cellules transfectées, étape critique durant laquelle un plasmide classique est souvent perdu dans le cytoplasme, les plasmides GTU restent associés aux chromosomes (Krohn et al., 2005) et se répartissent dans les noyaux des cellules filles. Ainsi les plasmides GTU sont conservés bien plus longtemps après transfection par rapport aux plasmides classiques. La quantité de protéine produite est par conséquent supérieure et plus durable dans le

temps avec la technologie GTU comparée à celle obtenue avec un plasmide CMV classique (Figure 9) (Krohn et al., 2005).



**Figure 9 : maintenance du vecteur GTU dans les cellules en division**

La technologie GTU induit une conservation du vecteur GTU dans les cellules en division induisant une conservation du plasmide dans les cellules en division (d'après Krohn et al., 2005).

## 2. Le vecteur nucléaire auxoGTUmultiHIV<sub>B</sub>

La cassette C1 du vaccin auxo-GTUmultiHIV<sub>B</sub> (Figure 8) code une multi-protéine de fusion contenant les séquences consensus entières des gènes *rev*, *nef*, *tat*, ainsi que les protéines p17 et p24 du gène *gag* du HIV-1 clade B. De même, cette protéine contient également 11 épitopes de lymphocytes T (CTL), sélectionnés dans les protéines Env et Pol pour leur présentation par les molécules de classe I du CMH humain (HLA). Les segments géniques codant les séquences d'intérêt sont des gènes synthétiques dont les codons ont été optimisés pour leur expression dans les cellules humaines (Blazevic et al., 2006).

## II- Immunogénicité du vaccin auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> chez le macaque

L'immunogénicité du vaccin ADN auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> formulé à 1mg/ml en PBS a été étudié par notre laboratoire chez le macaque cynomolgus. Chaque animal a reçu à la semaine 0, 4 et 12 par voie i.d, avec ou sans EP, 1mg de vaccin ou de plasmide auxo-GTU vide comme contrôle, répartis sur 10 sites (soit 100µg par site). Les animaux recevant en dose final 3mg de vaccin (Martinon et al., 2009).

### 1. Réponse humorale

La vaccination par le vaccin auxo-GTUmultiHIV<sub>B</sub> induit une réponse humorale, plus spécifiquement contre Gag et Nef, détectable dans le sérum des animaux vaccinés, significative par rapport aux

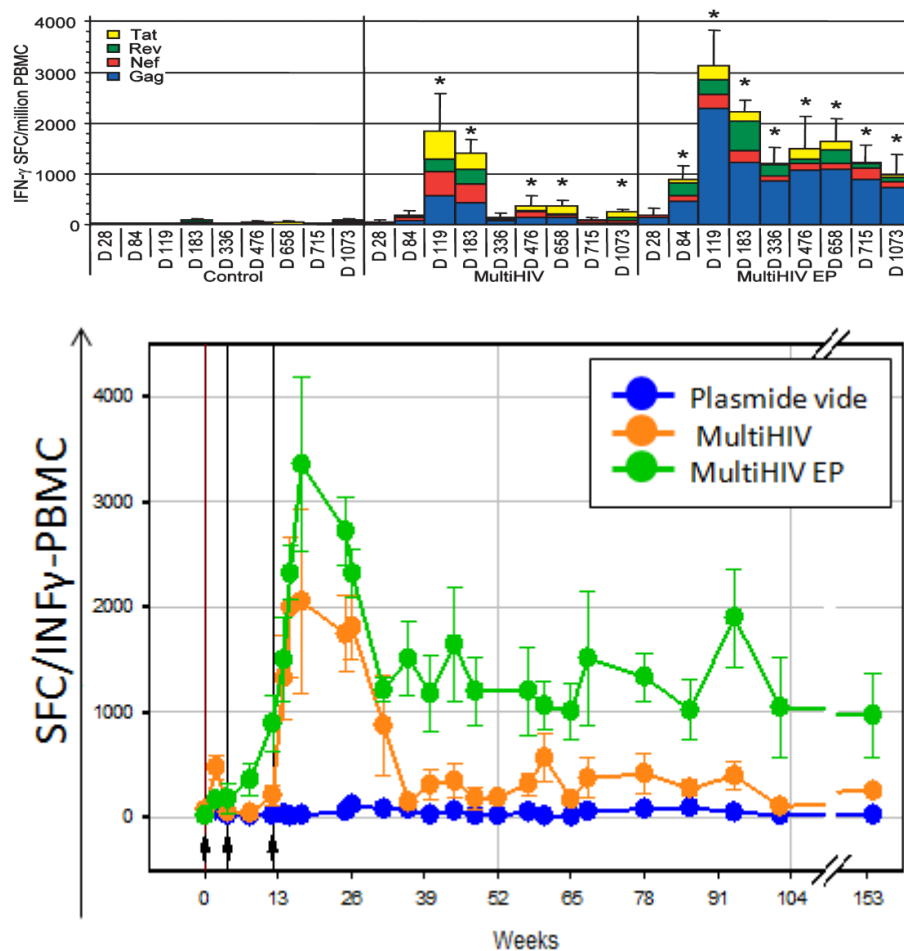
animaux contrôles ayant reçu le vecteur auxo-GTU vide. Bien que cette réponse soit plus intense chez les animaux vaccinés en association avec EP, elle ne dure pas dans le temps et diminue dès 4 mois après la dernière immunisation dans les groupes vaccinés avec EP et sans EP. Cependant l'EP semble avoir un impact sur l'établissement de cette réponse, en effet, les animaux vaccinés avec EP séroconvertissent plus rapidement, avant la dernière immunisation alors que peu d'animaux deviennent séropositifs même après la dernière injection dans le groupe vacciné avec le plasmide seul sans EP. Bien que le taux d'anticorps anti-Tat soit faible et 10 fois inférieur aux taux d'anticorps anti Nef et Gag, cette quantité est suffisante pour induire une neutralisation de l'activité de Tat *in vitro* et ce, plus particulièrement pour le groupe vacciné avec EP (Martinon et al., 2009).

Ces résultats démontrent que la vaccination par le plasmide auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> induit une réponse de type humoral principalement contre Gag et Nef mais insuffisante. Cette réponse ne perdure pas dans le temps, et, bien que l'EP permette d'intensifier le taux d'anticorps induits, elle n'engendre pas une réponse plus durable.

## 2. Réponse cellulaire

Le vaccin auxo-GTUmultiHIV<sub>B</sub> induit une production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T spécifiques des antigènes vaccinaux. Cette réponse est significativement différente du groupe contrôle immunisé avec un plasmide vide et détectable dans le sang pendant au moins 3 ans. L'EP permet d'augmenter drastiquement l'intensité de cette réponse (Figure 10). Cette vaccination induit des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> polyfonctionnels produisant majoritairement de l'IFN $\gamma$  et de l'IL2. (Martinon et al., 2009).

La vaccination des macaques par le vaccin auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> induit donc une forte réponse de type cellulaire et ce plus particulièrement avec EP. De plus, les animaux vaccinés avec EP montrent des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques polyfonctionnelles, avec une quantité importante de lymphocytes capables de produire au moins 2 cytokines. Les réponses polyfonctionnelles étant associées avec des réponses immunitaires plus efficaces et un meilleur contrôle de la virémie (Koup and Douek, 2011).



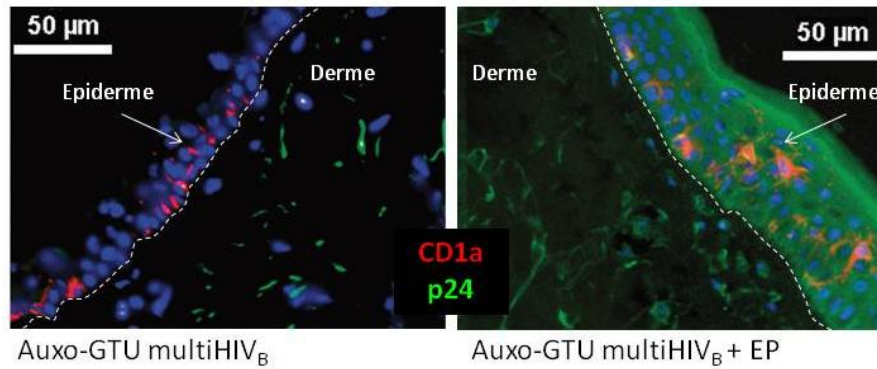
**Figure 10 : immunogénicité de type cellulaire induite par le vaccin auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub>**

Production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T spécifiques des antigènes Tat, Rev, Nef et Gag après immunisation avec un plasmide auxo-GTU vide (control, à gauche), auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> (milieu), auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> avec EP (droite) (Martinon et al., 2009) (A). Cumule des réponses IFN $\gamma$  spécifiques contre les antigènes vaccinaux après immunisation avec un plasmide vide (bleu), auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> (orange) ou auxo-GTU multiHIV<sub>B</sub> avec EP en fonction du temps (modifié d'après Martinon et al., 2009) (B).

### III- Production locale d'antigène

Au vu de la très bonne réponse de type cellulaire obtenu chez les animaux vaccinés notamment en association avec une EP locale, l'équipe de Frédéric Martinon s'est intéressée à la production locale d'antigène au niveau du site d'injection du vaccin.

L'injection intradermique du vaccin auxo-GTU sans EP induit une synthèse de l'antigène vaccinal exclusivement par les cellules du derme avec un pic d'expression 24h après immunisation (Martinon et al., 2009). D'autres études ont également démontré un pic de production d'antigène à 24h suite à une vaccination ADN par voie cutanée (Torres et al., 1997).



**Figure 11 : production de l'antigène vaccinal dans la peau.**

24h après vaccination par voie i.d sans EP (gauche) ou avec EP (droite) l'antigène vaccinal est détecté par l'intermédiaire de la production de la protéine p24 en vert. Les cellules de Langerhans CD1a<sup>+</sup> sont visibles en rouge dans l'épiderme, (d'après Martinon et al., 2009).

L'EP modifie de façon remarquable la quantité de protéine synthétisée et sa localisation. En effet une plus grande quantité de protéine vaccinale est synthétisée, suite à l'EP, qui facilite la transfection des cellules par le vaccin ADN. De plus L'EP permet une production de l'Ag vaccinal à la fois par les cellules du derme et de l'épiderme, avec des quantités d'antigène dans l'épiderme bien supérieure à celle du derme (Figure 11) (Martinon et al., 2009).

Une caractérisation plus approfondie de la synthèse de l'antigène vaccinal dans l'épiderme révèle que toutes les couches de l'épiderme produisent l'antigène. Néanmoins cette expression est significativement plus intense dans les couches de kératinocytes différenciés, au niveau du stratum corneum ou couche cornée. De plus il semble que la vaccination ait un impact sur la population de LC résidentes de l'épiderme. Dans la peau non traitée ou vaccinée sans EP, les LC sont localisées au niveau de la lame basale, alors qu'après vaccination avec EP ces cellules sont plutôt localisées au niveau des couches supérieures de l'épiderme (Figure 11). En outre, les LC proches de la couche basale ne sont pas positives pour l'antigène vaccinal alors que celles proches de la couche cornée le sont (Martinon et al., 2009). Il semblerait que les LC après vaccination avec EP migrent vers la surface de l'épiderme, lieu où l'antigène vaccinal est fortement synthétisé, pour le capturer.

#### IV- Choix de la stratégie de vaccination

Le vaccin auxoGTU multiHIVB administré par voie i.d chez le macaque cynomolgus induit une forte réponse de type cellulaire drastiquement augmentée lorsqu'une EP est réalisée au niveau du site d'injection. Afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques précoces impliqués lors d'une réponse vaccinale intense et durable, nous avons choisi d'étudier la réponse immunitaire locale induite par la vaccination i.d par le plasmide auxoGTU en association à une EP.

## RESULTATS

### **Article 1 : Electroporation mediated intradermal delivery of DNA vaccines in nonhuman primates**

Lucille Adam, Roger Le Grand et Frédéric Martinon

Chapitre de livre paru dans Electroporation Protocols Methods in molecular biology volume 1121, 2014, pp 309-313

Ce chapitre de livre détaille la stratégie de vaccination par de l'ADN injecté par voie intradermique associé à une électroporation (EP) locale du site d'injection adapté au primate non humain.

La vaccination par de l'ADN seul a montré de très bons résultats chez le petit animal de laboratoire, cependant, chez l'homme et dans des modèles animaux de vaccination plus pertinents comme ceux utilisant les primates non humains, les premiers résultats se sont révélés très décevants. Néanmoins, la vaccination par de l'ADN ayant de nombreux avantages comme sa bonne innocuité, les possibilités multiples d'ingénierie moléculaire, sa stabilité à température ambiante, la facilité de production et son faible coût de fabrication ont motivé la recherche de méthodes permettant d'accroître son efficacité (Hutnick et al., 2011). L'une de ces stratégies envisagées consiste en une EP locale, au site d'injection, afin de faciliter l'entrée de l'ADN dans les cellules. Le signal électrique délivré lors de l'EP déstabilise les membranes cytoplasmiques qui deviennent perméables permettant ainsi l'entrée de macromolécules comme l'ADN dans les cellules (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010).

L'EP a, dans un premier temps, été proposée pour la vaccination ADN par voie intramusculaire. Cependant, comme illustré dans le chapitre d'introduction de notre mémoire, la peau se révèle particulièrement attrayante pour délivrer des vaccins. L'EP par voie cutanée présente également l'avantage d'être non invasive.

Ce manuscrit décrit donc le matériel nécessaire, la procédure à appliquer ainsi que les paramètres à prendre en compte pour réaliser une vaccination ADN avec EP par voie intradermique. Les tests ont été réalisés chez le primate non humain.



## **Electroporation mediated intradermal delivery of DNA vaccines in nonhuman primates**

Lucille Adam <sup>a</sup>, Roger Le Grand <sup>a</sup> and Frédéric Martinon <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> CEA, Division of Immuno-Virology, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), Fontenay-aux-Roses, France; UMR E1, Université Paris-Sud, Orsay, France; Vaccine research institute (VRI), Créteil, France

<sup>b</sup> Inserm U1016, Paris, France

\* Corresponding author: Frédéric Martinon, CEA, Division of Immuno-Virology, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France; e-mail: frederic.martinon@cea.fr

**Running Head:** Intradermal delivery in nonhuman primate

**Summary**

Strategies to improve vaccine efficacy are still required. The immunogenicity of DNA vaccine is strongly improved by electroporation (EP). The skin is populated with a wide variety of immune cells, making it an attractive tissue for vaccine delivery. Here we describe a method for the EP mediated intradermal delivery of DNA vaccines in nonhuman primates, as a model for preclinical development of human vaccines, using non-invasive needleless electrodes.

**Key Words:** DNA, vaccine, electroporation, skin, nonhuman primate

## 1. Introduction

The skin is the first line of defense to protect the body from dehydration, injury and infection (1). It is populated with a wide variety of immune cells, including dendritic cells (DCs), making it the largest immunological tissue of the human body. Although intramuscular delivery has been the most widely used route of administration of vaccine, skin is a very attractive tissue for vaccination (2,3). Anti-smallpox vaccine was the most successful vaccine for humans and was administered by skin scarification or puncture; BCG and new commercial Flu vaccines are injected by intradermal (I.D) route (4). At steady state, the human skin is rich in cells specialized in immune-surveillance, including Langerhans cells (LCs) in epidermis and several subsets of DCs and macrophages in dermis (5). These potent antigen presenting cells sample the antigens in their environment by diverse mechanisms, can be activated by “danger signals” and migrate to the draining lymph nodes to interact with antigen-specific T and B lymphocytes, resulting in the priming and induction of adaptive immune response. I.D administration of plasmids in association with electroporation (EP) is one of the most efficient non-viral methods for the delivery of gene into the skin (6,7) and is suitable to deliver DNA vaccine when a Th1-oriented response is desired (8).

In a previous work conducted in nonhuman primates (NHPs), which share very similar immune system organization with humans (9-11), allowing prediction of immunogenicity, we demonstrated that I.D delivery of a plasmid, combined with EP, strongly enhanced the expression of the vaccine antigen in the epidermis (12). The results suggested a strong involvement of LCs in the induction of Th1-oriented responses, characterized by the persistence, over 2 years, of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> antigen specific T lymphocytes. Here, we describe the method used for EP mediated I.D delivery of DNA vaccines in NHPs. A special feature of the described method is to use needleless external electrodes, by contrast with usual methods for large animal models.

## 2. Materials

1. Sterile phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (Gibco Life Technologies, Paisley, UK).
2. Plasmids adjusted at 1 mg/ml in sterile PBS (*see Note 1*). Prepare 1 ml per animal plus 10% to compensate the lost when filling the syringes.
3. Adult cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) from Mauritius, weighing 3 to 6 kg.
4. Ketamine chlorhydrate (Imalgene® 1000, Merial, Lyon, France).
5. Ethanol 70%.
6. Sterile syringes with needle 29G x 1/2" (Myjector® 1ml, Terumo, Leuven, Belgium).
7. Nepa Gene CUY21 EDIT electroporator (Sonidel Ltd, Dublin, Ireland).
8. Tweezers electrodes 10 mm in diameter (ref: CUY650-10, Sonidel Ltd).
9. Gel for electrodes (Spectra 360, Parker Laboratories, Fairfield, NJ, USA).
10. DNA decontamination solution (RNase AWAY, Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA)

## 3. Methods

### 3.1. Intradermal injection

1. Sedate the animals with ketamine chlorhydrate (10-15 mg/kg).
2. Shave the back of the animals.
3. Clean the shaved skin with ethanol 70%.
4. Fill the syringe with 1 ml of plasmid solution and inject ID (*see Note 2*) 100 µL per site of plasmid in PBS, 10 sites per animal (Fig. 1). Space the injection sites out 2-3 cm apart.

### 3.2 Determine the optimal voltage for electroporation

1. Set up the electroporator program to 6 square-wave pulses of 10 ms with 90 ms intervals at 110 volts.
2. Save the program in the electroporator memory.
3. Put a small amount of gel (*see Note 3*) on two sites 2-3 cm apart of shaved untreated skin.
4. Fold the skin between both sites (Fig. 2A).
5. Place the electrodes on each spot of gel (Fig. 2B).
6. Maintain firmly and start the electroporator.
7. Read the output current intensity, which should be comprised between 300 and 700 mA (*see Note 4*).
8. If necessary adjust the voltage to reach the recommended intensity.

### 3.3 Proceed to the electroporation of the sites of injection

1. Put a small amount of gel on each plasmid injection site.

2. Fold the skin between 2 adjacent sites and proceed to the electroporation. Repeat this step for the 5 pairs of injection site (see **Note 5**).
3. Remove the gel from the skin with ethanol 70%.
4. When completed, unplug the electrodes and clean them with ethanol 70% then with the DNA decontamination solution.
5. For optimum immune response, one or two boost should be performed 6 to 8 weeks later.

#### 4. Notes

1. In our hands, best antigen expression was obtained with recombinant auxo-GTU<sup>®</sup> plasmids (13) provided by FIT Biotech (Tampere, Finland), nevertheless, very good level of expression were also observed with pCMV vectors.
2. This step needs practice. For best results, the intradermal injection should be as superficial as possible. For this purpose, stretch the skin, orient the needle bevel upper and introduce the needle in the skin with a straight angle. Press the plunger slowly. The lightening of the skin and the high resistance mean that the injection is delivered in the superficial part of the skin. When reaching 100 µl wait for the decrease of the pressure (2-3 seconds) before removing the needle.
3. The role of the conductive gel is to ensure good contact between the electrodes and skin. Nevertheless, use moderate amount of gel (the size of a grain of wheat for each electrode) to avoid continuity between both sites; otherwise, the current will go directly through the gel rather than through the skin.
4. The intensity of the output current is mainly dependent on three parameters:
  - i) the tension of the current (voltage) between both electrodes. This parameter can be easily adjusted in the operating procedure of the Nepa Gene CUY21 EDIT electroporator;
  - ii) the thickness of the skin. It is variable between animals, avoid fat animals;
  - iii) the pressure applied to the tweezers electrodes. The use of a rubber band may help to keep a constant pressure.
 All together, these parameters did not cause any tissue damage and increased the uptake of reporter plasmid into skin cells.
5. Although the epidermis is oriented to the cathode for one site and to the anode for the other site of the pair, we never observed any differences at the level of antigen expression between both sites.

## 5. References

1. Fuchs, E., and Raghavan, S. (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* **3**, 199-209.
2. Stoitzner, P., Green, L.K., Jung, J.Y., et al. (2008) Tumor immunotherapy by epicutaneous immunization requires langerhans cells. *J Immunol* **180**, 1991-1998.
3. Vogt, A., Mahe, B., Costagliola, D., et al. (2008) Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* **180**, 1482-1489.
4. Frenck, R.W., Jr., Belshe, R., Brady, R.C., et al. (2011) Comparison of the immunogenicity and safety of a split-virion, inactivated, trivalent influenza vaccine (Fluzone(R)) administered by intradermal and intramuscular route in healthy adults. *Vaccine* **29**, 5666-5674.
5. Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.N., et al. (2009) Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* **206**, 371-385.
6. Andre, F.M., Gehl, J., Sersa, G., et al. (2008) Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther* **19**, 1261-1271.
7. Hirao, L.A., Wu, L., Khan, A.S., et al. (2008) Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* **26**, 440-448.
8. Vandermeulen, G., Staes, E., Vanderhaeghen, M.L., et al. (2007) Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release* **124**, 81-87.
9. Malleret, B., Maneglier, B., Karlsson, I., et al. (2008) Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* **112**, 4598-4608.
10. Romain, G., van Gulck, E., Epaulard, O., et al. (2012) CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur J Immunol* **42**, 2019-2030.
11. Wonderlich, E.R., Kader, M., Wijewardana, V., et al. (2011) Dissecting the role of dendritic cells in simian immunodeficiency virus infection and AIDS. *Immunol Res* **50**, 228-234.
12. Martinon, F., Kaldma, K., Sikut, R., et al. (2009) Persistent immune responses induced by a human immunodeficiency virus DNA vaccine delivered in association with electroporation in the skin of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **20**, 1291-1307.
13. Blazevic, V., Mannik, A., Malm, M., et al. (2006) Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with a novel gene transport unit (GTU)-MultiHIV DNA vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 667-677.



Fig. 1. Intradermal injection



Fig. 2. Placing the tweezers electrodes for electroporation. Fold the skin between the desired sites (A) and carefully place the electrodes on both sites (B).

## **Article 2: Development of a twelve-parameter flow cytometry panel to identify skin immune cells in non-human primates**

Lucille Adam, Antonio Cosma, Roger Le Grand, Frédéric Martinon

Article en préparation pour « The Journal of Immunological Methods »

Le macaque cynomolgus est un modèle d'étude de l'immunité intéressant du fait de sa proximité génétique avec l'homme. De nombreux réactifs sont aujourd'hui disponibles et permettent la caractérisation fine des cellules simiennes. Cependant à notre connaissance peu d'études décrivent les cellules immunitaires peuplant la peau de macaque.

Ce manuscrit décrit les approches que nous avons développées pour identifier les différentes populations de cellules immunitaires de la peau du macaque cynomolgus. Les techniques mises au point devaient être adaptées à des échantillons de petite taille afin de permettre ultérieurement des biopsies répétées chez les animaux.

Afin d'étudier les populations cellulaires du tissu épidermique et dermique, notre protocole implique une séparation par traitement enzymatique du derme et de l'épiderme puis une nouvelle digestion enzymatique suivie d'une dissociation mécanique de chaque feuillet. L'épiderme est un tissu fin (moins de 100  $\mu$ m) (Hammond et al., 2000) riche en cellules jointives (Morita et al., 2011). Le derme est plus épais (environ 2mm), il est riche en matrice extracellulaire mais présente une densité cellulaire faible. Les suspensions cellulaires générées contiennent donc un nombre très faible de cellules et une quantité importante de cellules mortes et de débris.

Ce protocole nécessite un marqueur de viabilité permettant l'exclusion des débris et des cellules mortes très autofluorescentes et fixant les Ac de façon non spécifique. Il contient également une combinaison d'Ac spécifiques permettant d'identifier les différentes populations de cellules immunitaires. Le CD45 permet de discriminer les leucocytes des autres populations telles que les kératinocytes ou les fibroblastes, très abondants dans la peau. Le CD3 est utilisé pour identifier les lymphocytes T. Le CD66 permet d'isoler les granulocytes. Le marqueur HLA-DR identifie les APC, et les marqueurs CD11b, CD163, CD14 permettent de discriminer les macrophages alors que les marqueurs CD11c, CD1a, CD1c et CD123 permettent de discriminer les différentes populations de DC. Afin de limiter les problèmes de compensation générés par l'utilisation simultanée de nombreux fluorochromes, nous avons choisi d'utiliser le CD123 et le CD163 ciblant respectivement les pDC et



les macrophages couplés au même fluorochrome. La double négativité des pDC pour le CD14 et le CD11b et la double positivité des macrophages tissulaires, pour ces deux marqueurs, permettent la discrimination entre ces deux populations.

Dans l'épiderme, nous avons identifié les cellules de Langerhans  $\text{HLADR}^+\text{CD1a}^+\text{CD1c}^-$  et les lymphocytes intra-épithéliaux  $\text{CD3}^+$  qui sont les seules populations leucocytaires peuplant l'épiderme en condition physiologique. Nous avons également suggéré la présence de cellules présentant une morphologie de lymphocytes  $\text{CD3}^-\text{HLA-DR}^-$  correspondant potentiellement à des cellules NK.

Dans le derme, en condition physiologique, nous avons identifié deux populations de cellules  $\text{HLA-DR}^+\text{CD11c}^+$  exprimant le CD1a. La première population est également positive pour le CD1c et correspond au DDC  $\text{CD1a}^+$  décrite chez l'homme (Klechevsky, 2013). La seconde est négative pour le CD1c et exprime un phénotype très similaire au LC de l'épiderme et peut donc correspondre à des LC en migration au travers du derme. Le derme présente une population de macrophages résidants  $\text{CD14}^+\text{CD11b}^+\text{CD163}^{\text{high}}$ . La présence de granulocytes, caractérisés par leur phénotype  $\text{CD66}^+\text{HLA-DR}^-$ , est variable selon les animaux mais ces cellules sont généralement faiblement représentées en condition normale. Le derme contient également une population de lymphocyte T  $\text{CD3}^+$ . Tout comme dans l'épiderme, une population de cellules présentant une morphologie lymphocytaire  $\text{CD3}^-$  est observée. La plupart de ces cellules sont  $\text{HLA-DR}^-$ , elles correspondent probablement à des cellules NK. Cependant de rares cellules  $\text{HLA-DR}^+$  pouvant correspondre à des lymphocytes B sont occasionnellement observées.

Les DC plasmacytoïdes  $\text{CD14}^-\text{CD11b}^-\text{CD123}^+$  sont absentes dans la peau en condition normale.

Les cellules identifiées dans la peau peuvent également être mises en évidence dans les nœuds lymphatiques drainant la peau en utilisant une stratégie d'analyse similaire à celle utilisée dans la peau. Les marqueurs CD8 et CD20 ont été ajoutés afin d'exclure toutes les populations lymphocytaires présentes dans les nœuds lymphatiques. Cette approche permet une première estimation des APC de la peau ayant migré dans les nœuds lymphatiques ainsi que l'identification des APC résidentes comme les cDC  $\text{HLA-DR}^+\text{CD11c}^+\text{CD1a}^-$  et les pDC  $\text{CD14}^-\text{CD11b}^-\text{CD123}^+$ .

Ce panel permet donc d'identifier les différentes populations de cellules immunitaires dans la peau de macaque en condition physiologique et de les identifier dans les nœuds lymphatiques, lieu de la mise en place d'une réponse immunitaire après leur migration à partir du tissu cutané.

## Identification of skin immune cells in non-human primates

### Authors

Lucille Adam<sup>a,b,c</sup>, Antonio Cosma<sup>a,b,c</sup>, Roger Le Grand<sup>a,b,c</sup>, Frédéric Martinon<sup>a,b,c,d,\*</sup>

### Affiliations

<sup>a</sup> CEA, Division of Immuno-Virology, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>b</sup> UMR E1, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

<sup>c</sup> Vaccine Research Institute (VRI), 94010 Créteil, France.

<sup>d</sup> Inserm, 75014 Paris, France.

\* Corresponding author: CEA, Division of Immuno-Virology, iMETI, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. Tel +33 1 4654 8757, fax: +33 1 4654 7726. E-mail address: [frederic.martinon@cea.fr](mailto:frederic.martinon@cea.fr) (F. Martinon)

**Abbreviations used in this article**

Ab, Antibody; Ag, Antigen; APC, antigen presenting cells; DC, dendritic cell; DDC, dermal DC; LC, Langerhans cell; LN, Lymph node; Mac, Macrophage; mDC, myeloid DC; mLC, migratory LC; Mono, Monocytes; NHP, nonhuman primate; NK cells: Natural killer cells; pDC, plasmacytoïd DC; PMNs, polymorphonuclear cells; res, resident; vs, versus.

## Abstract

Non-human primates are an essential model for immunological research notably in vaccination. The skin is an interesting target for vaccine delivery because it contains lots of immune cell populations, notably antigen presenting cells. Immune cells in mice and human skin have been extensively described but few studies are available on skin immune cells in non-human primates. The aim of this work was to describe immune cell populations in the epidermis, dermis and skin draining lymph nodes in cynomolgus macaques by a single 12-parameter flow cytometry protocol. Skin cells share several markers, consequently, we defined a gating strategy to identify accurately immune cells and limit contamination of one immune cell population by another. The epidermis contains  $CD1a^+CD1c^-$  Langerhans cells (LCs),  $CD3^+$  T cells and putative NK cells. The dermis contains  $CD1a^+CD1c^-$  cells, which present similarities with LCs,  $CD1a^+CD1c^+$  dermal dendritic cells (DDCs),  $CD163^{high}CD11b^+$  resident macrophages,  $CD3^+$  T cells and putative NK cells. We found  $CD66^+$  polymorphonuclear cells in some of the animals. Immune cell populations in the macaque are similar to those in humans despite moderate differences in phenotype. We identified migratory LCs,  $CD1a^+CD1c^+$  DDCs and macrophages in skin draining lymph nodes. The simultaneous identification of these different immune cells in one panel avoids the use of large amounts of precious sample and may contribute to a better understanding of immune mechanisms taking place in the skin after treatment or vaccine delivery.

## Keywords

dendritic cells, immune cells, skin, lymph nodes, flow cytometry, cynomolgus macaque

## 1. Introduction

The skin is made up of three layers and participates in organism defense by its physical and immunological properties (Kupper and Fuhlbrigge, 2004). The outer layer, the epidermis, is composed of 90% keratinocytes (Nestle et al., 2009) which are linked to corneocytes at the supra-layer by thigh-junctions, giving the skin its hermetic properties (Elias et al., 2001; Brandner et al., 2002; Morita et al., 2011). Underneath, the dermis provides the strength and elasticity of the skin through an abundant extracellular matrix rich in collagens, elastic fibers and reticulin (Shimizu, 2007). Finally, the underlying hypodermis is mostly composed of adipocytes. The skin contains lots of immune cells including antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs) and macrophages, as well as T cells which are sentinels that watch for potential injury or infection (Kupper and Fuhlbrigge, 2004; Nestle et al., 2009) and protect against pathogens (Jiang et al., 2012). DCs are an important heterogeneous population (Ju et al., 2010) that recognize various antigens (Ag) through their rich expression of pattern recognition receptors (Cerboni et al., 2013) and are the most effective population that can activate and induce the differentiation of naïve T cells (Steinman and Witmer, 1978; Zaba et al., 2007; Iijima et al., 2011; van Spriel and de Jong, 2013). In response to Ag recognition, DCs activate, mature and migrate to draining lymph nodes (LNs), where they present Ag to T cells (Villablanca and Mora, 2008; Haniffa et al., 2012; Murakami et al., 2013). Several studies have demonstrated that the involvement of DC subsets and their activation lead to the orientation of the immune response into Th1, Th2, Th17, Th22 or T regulator cells (Jonuleit et al., 2000; Kapsenberg, 2003; Klechevsky et al., 2008; Jongbloed et al., 2010; Li et al., 2012; Seneschal et al., 2012). Consequently, the presence of DCs and the microenvironment generated at infected or vaccinated sites, are two crucial variables involved in adaptive immune responses that are important to understand immunological mechanisms. For these reasons, the skin is an attractive organ to study immunity, auto-immune diseases or response to vaccination.

Several APCs, all expressing CD45 and HLA-DR, have been described in human skin (Valladeau and Saeland, 2005). Human Langerhans cells (LCs) are a population of DCs that express a high level of CD1a, CD207 and HLA-DR (Klechevsky et al., 2008; Fujita et al., 2009; Furio et al., 2010). These cells are located in the epidermis where they form a dense network with long dendrites between keratinocytes (Pearson et al., 2010). The dermis contains CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> dermal DC (DDCs) and CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> DDCs, which both express the myeloid DC markers CD11c and CD1c (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993; Klechevsky et al., 2008; Furio et al., 2010). Several subsets of skin APCs share the expression of CD14. It is mainly

expressed by monocytes and monocyte-derived APCs such as macrophages and some DC subsets. Two populations of CD141<sup>+</sup>DDCs with opposite functions were described recently, according to CD14 expression (Chu et al., 2012; Haniffa et al., 2012). CD141<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> DDCs are strong stimulators of T cells (Haniffa et al., 2012), whereas CD141<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> DDCs are involved in skin tolerance and the inhibition of inflammation through the induction of T regulatory cells (Chu et al., 2012). A population of CD163<sup>+</sup> cells, corresponding to resident macrophages and also expressing CD14, is present in the dermis (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008; Haniffa et al., 2009). In addition, normal skin contains CD3<sup>+</sup> T cells with homing specificities (Clark et al., 2006; Nestle et al., 2009). These populations have been largely described in humans (Clark et al., 2006; Zaba et al., 2007; Klechevsky et al., 2008; Ochoa et al., 2008; Chu et al., 2012; Haniffa et al., 2012) and in mice (Bursch et al., 2007; Henri et al., 2010; Chodaczek et al., 2012; Jiang et al., 2012; Gao et al., 2013; Kumamoto et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013). Conversely, few studies have described skin populations in non-human primates (NHP) (Romain et al., 2012), which are essential models to study human infectious disease (Gardner and Luciw, 2008) and responses to vaccine because of their close genetic relationship with humans (Herodin et al., 2005; Yan et al., 2011). Importantly, NHP models are essential to conduct invasive studies in the skin that will be impractical to perform in humans. Despite few differences, leukocyte phenotypes are similar in human and NHP. Monoclonal antibodies directed against human markers often cross react with the simian counterpart (Herodin et al., 2005).

The phenotypes of APCs isolated from the skin and the number of subpopulations identified is affected by the extraction protocol (Bond et al., 2009; Stoitzner et al., 2010; Chu et al., 2011). Some studies obtain immune cells by a migration process. In this procedure, the epidermis and dermis are enzymatically separated and are incubated in medium with or without the addition of cytokines (Klechevsky et al., 2008; Stoitzner et al., 2010). Then, immune cells are retrieved in medium after several days of culture. This process can obtain DCs with a high efficiency, but cells with poor migratory properties such as tissue resident macrophages are not recovered (Haniffa et al., 2009). Alternatively, tissue digestion with enzyme and mechanical disruption enables potentially all skin cell populations to be extracted in a short period of time (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008; Stoitzner et al., 2010). Consequently, this procedure avoids the exposure to cytokines and in vitro migration, which activate recovered APCs (Zaba et al., 2007; Klechevsky et al., 2008).

In this study, we used the tissue digestion and mechanical disruption protocol to extract skin cell populations from 8 mm punch biopsies from cynomolgus macaques. We used a 12-

parameter flow cytometry panel and a peculiar gating strategy to study skin immune cell populations present in healthy skin. The simultaneous analysis of 12 parameters compensated for the limited number of extracted cells permitted direct comparison of skin-derived DCs in dermis and epidermis as well as in skin draining LNs.

## 2. Materiel and methods

### 2.1. Animals

Adult male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) imported from Mauritius and weighing 4-9Kg, were housed in CEA facilities (accreditation number: B 92-032\_02) and handled (investigator accreditation no.: RLG, B 92-073; FM, C 92-241) in accordance with European guidelines for NHP care (EU Directive N 2010/63/EU). Before the start of the study, animals were tested and found to be seronegative for several pathogens (SIV, STLV, filovirus, HBV, herpes B and measles). Animals were sedated with ketamine chlorhydrate (10–20 mg/kg, Rhone-Mérieux, Lyon, France) in 10% acepromazine (Vtranquil, Ceva Santé Animale, France) during handling. This study was approved by the regional animal care use committee (*Comité Régional d’Ethique Ile de France Sud*, reference 11\_013).

### 2.2. Skin samples

Eight mm skin biopsies were performed on sedated animals at steady state. Cells were extracted from fresh biopsies with modified versions of published protocols (Bond et al., 2009; Stoitzner et al., 2010). Fat tissue was removed and the sample was incubated with 4 mg/ml of bacterial protease dispase II (Roche Diagnostic, Meylan, France) in PBS with 1% Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) Antibiotic Mixture (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France) and 1% Fungizone Antimycotic (Gibco, Life Technologies) for 12 to 16 h at 4°C, and then for 40 min at 37°C. Epidermal and dermal sheets were separated and incubated in type D collagenase 2 mg/ml (Roche Diagnostic, Meylan, France), 0.2 mg/ml DNase I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in RPMI 1640 at 37°C with shaking, for 20 min (epidermal sheets) or 40 min (dermal sheets). Next, the epidermis was incubated with trypsin 0.25X (Eurobio, Courtaboeuf, France) for 10 min, the tissue remaining was mechanically dissociated and the cellular suspension obtained was filtered (100 µm). The dermis tissue was mechanically dissociated further with a gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) and the cellular suspension obtained was filtered (100 µm).

### 2.3. Lymph node samples

Samples of inguinal LN from healthy animals were taken from sedated animals. Lymph node cells were obtained after 40 min of 2 mg/ml collagenase digestion of tissue and mechanical dissociation of the digest with a gentleMACS dissociator. The suspension was filtered on a 70 µm pore-sized filter.



#### *2.4. Antibodies used for the study*

We aimed to characterize macaque immune skin cells by flow cytometry with a single mix of antibodies (Ab). The Ab used in this study are listed in Table 1. CD1a, CD123 and CD163 Ab were uncoupled and labeled with fluorochrome just before staining with the Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Life Technologies). CD1a was labeled with the IgG1-AF700 kit, CD163 was labeled with the IgG1-AF594 kit, and CD123 was labeled with the IgG2a-AF594 kit, all according to the supplier's procedure. Antibody-capture beads (goat anti mouse IgG control kit) (Gentaur molecular products, Paris, France) were used in the study to generate a compensation matrix (Supplementary Table S1).

#### *2.5. Staining protocol*

Extracted cells were incubated for 20 min in 1 ml of PBS containing 1% Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Life Technologies), and washed once with 25 ml of PBS. Then, cells were suspended in 50 µl of FACS staining solution (PBS 3% fetal calf serum, 2 mM EDTA) supplemented with 5% of macaque serum to block FcR and to limit unspecific staining. 30 to 45 min later, cells were mixed with antibodies in a final volume of 150 µl of FACS staining solution, and incubated for 20 min at 4°C in the dark. After staining, cells were washed with 800µl of FACS staining solution 3 times and were fixed in BD CellFIX 1X (BD, Biosciences).

#### *2.6. Data acquisition*

Samples were collected on a BD LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo 9.7.1 software (Treestar, Ashland, OR, USA).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Twelve-parameter flow cytometry panel to phenotype skin immune cells

DCs are an essential immune cell population able to take up Ag and present it to T cells to stimulate adaptive immunity. However, DCs are a rare, heterogeneous and complex population and a combination of surface markers are needed to identify these cells because no specific DC markers exist (Hume, 2008; Merad et al., 2013). Consequently, a large panel of markers is required to correctly identify various DC subsets. The number of skin biopsies that can be carried out per animal is limited, especially when investigating local effects over time with different experimental conditions. Therefore, we developed our protocol from one skin biopsy of 8 mm. We designed a 12-parameter flow cytometry Ab panel to phenotype immune cell populations in dermis and epidermis in cynomolgus macaques. Furthermore, this Ab panel also allowed studying the skin-derived APCs in the draining LNs. For dermis and epidermis, we treated 8 mm skin biopsies with dispase to separate epidermal and dermal layers, which were then digested with collagenase and mechanically dissociated to obtain epidermal and dermal cell suspensions. The Ab panel is shown in Table 1 and the compensation matrix is shown in Supplementary Table S1. The CD45 marker enables leukocytes to be separated from most skin cells, including keratinocytes and fibroblasts. The CD66 marker stains PMNs and the anti-HLA-DR stains all APCs. CD11c, CD1c, CD1a and CD123 define DC subsets whereas CD11b, CD14 and CD163 markers define monocyte/macrophage subsets.

Anti-CD123, which targets plasmacytoid DCs (pDCs) and anti-CD163 Ab, which targets macrophages, were used in the same AF594 channel. These two populations can be discriminated with CD11b and CD14 markers, which are expressed by macrophages and are not expressed by pDCs (Fig. S1). This strategy limits the compensation between fluorochrome combinations that could be enhanced by the high level of auto-fluorescence featured by certain skin cells. The cell extraction process is known to generate important amount of debris and dead cells. Therefore, the staining protocol includes a live/dead staining. A representative analysis of 45 independent extractions is shown in Fig. 1A. A mean of  $90,927 \pm 63,701$  living epidermal cells and  $53,333 \pm 33,082$  living dermal cells were obtained (Fig. 1B).

#### 3.2. Immune cells in the dermis

We excluded dead cells, debris and doublets in the dermis by live/dead staining versus (vs) FSC (Fig. 2A), SSC vs FSC (Fig. 2B) and SSC-A vs SSC-H (Fig. 2C), respectively. Then we

selected CD45<sup>high</sup> cells (Fig. 2D), which correspond to leukocytes. We isolated T lymphocytes through CD3 expression and the SSC parameter (Fig. 2E). However, we could not discriminate T cells by CD4 and CD8 expression because the dispase protocol that we used to separate the epidermis and dermis degrades these markers. Skin T cells have been shown to be particularly important for protection (Clark et al., 2012; Jiang et al., 2012). Skin resident memory T cells are more effective than other memory T cells to protect against pathogens with skin tropism (Jiang et al., 2012)(Jiang et al., 2012). Therefore, it is informative to evaluate the number of these T cells at steady state or after skin treatment or vaccination. B cells and NK cells are mostly associated with an inflammatory context although they have also been reported in healthy skin (Ebert et al., 2006; von Bubnoff et al., 2010; Geherin et al., 2012). However, our Ab mixture lacks markers for these lymphocytes. B cells express HLA-DR whereas NK cells do not. We detected some CD3<sup>-</sup>CD45<sup>high</sup> cells with SSC and FCS parameters overlapping with those of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. S2A). These CD3<sup>-</sup> lymphocyte-like cells were mostly HLA-DR<sup>-</sup>; either a small proportion or none of these cells were HLA-DR<sup>+</sup>, depending on the animal. We assumed that the CD45<sup>high</sup>CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup> population corresponded to NK cells and that the CD45<sup>high</sup>CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> population corresponded to B cells.

We identified CD66<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> polymorphonuclear cells (PMNs) within the CD3<sup>-</sup> population (Fig. 2F) at steady state in some of the animals. We characterized APCs in the CD45<sup>high</sup>CD3<sup>-</sup>CD66<sup>-</sup> population and identified cells expressing CD1a from the CD1a vs CD123\_CD163 graph (Fig. 2G). Most of these cells expressed the myeloid DC marker CD11c and the APC marker HLA-DR (Fig. 2H). We divided CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> DCs into two subsets according to CD1c expression: CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> DCs and CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> DCs (Fig. 2I).

From the CD45<sup>high</sup>CD3<sup>-</sup>CD66<sup>-</sup>CD1a<sup>-</sup> cell population (Fig. 2G), we used the CD11b vs CD14 graph to discriminate monocytes/macrophages from pDCs; monocytes/macrophages are restricted to the CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> gate and pDCs are contained in the CD11b<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup> gate (Fig. 2J and Fig. S1). At steady state, CD14<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells included a unique CD123\_CD163<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup> population corresponding to resident dermal macrophages expressing high levels of CD163 (Fig. 2 K). Few CD14<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>CD163<sup>-</sup> cells could be identified. These cells may correspond to CD14<sup>+</sup> DDCs described in humans (Klechevsky et al., 2008), or to a population of monocytes infiltrating the dermis (Jakubzick et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013). Plasmacytoid DCs are normally absent in healthy dermis and are recruited during inflammation or autoimmune diseases such as psoriasis (Conrad et al., 2009). Consistent with the literature, we observed no or very few CD123<sup>+</sup> pDCs at steady state; these

are positive for the AF594-CD123\_CD163 channel inside the CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> gate (Fig. 2L).

The gating strategy used to isolate the different APC populations was critical, especially in the dermis. Indeed, because of the common origin of APCs, most of the markers used for discrimination are expressed, at various levels by several subsets (Fig. S3), which, in addition, are auto-fluorescent (Haniffa et al., 2009). CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> DCs emitted a medium strength signal in the AF594 channel CD123\_CD163 and expressed CD14. Therefore, these DCs can be included in the macrophage gate if they were not previously excluded. However, macrophages and CD1a<sup>+</sup> DCs form a continuous population for the expression of CD1a and CD11c, which makes discrimination between DCs and macrophages difficult (Fig. S3). Consequently, it is particularly important to separate CD1a<sup>+</sup> DCs from macrophages in the CD1a vs CD123\_CD163 graph (Fig. 2G) before analyzing these different APC populations.

DCs expressing CD141 have been described recently in human skin; these cells are the most effective cells to cross present Ag, which is particularly important for vaccination (Haniffa et al., 2012). However, we and others have demonstrated that CD141 Ab (clone: AD5-14H12) does not react with macaque cells and that clone 1A4 binds with a moderate to high affinity on monocytes, mDC and pDC (Autissier et al., 2010; Dutertre et al., 2014). Therefore, staining with CD141 is not specific to a particular cell subset in our animal model and so this surface marker was not included in our panel.

The percentage of each subset isolated at steady state is indicated in Fig. 2M. T cells and macrophages were the two main immune cell populations present in normal dermis. The CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> population contains the two CD1a<sup>+</sup> DC subsets which were poorly represented in the dermis similar to the CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> monocyte/DC subset. We found a low percentage of putative NK cells and almost no putative B cells in healthy macaque dermis.

### *3.3. Immune cells in the epidermis*

Similar to the dermis, we excluded dead cells (Fig. 3A), debris (Fig. 3B) and doublets (Fig. 3C) present in epidermis cell suspensions before selecting CD45<sup>high</sup> leukocytes (Fig. 3D). We isolated intraepithelial T cells, based on their size (SSC) and on the expression of CD3 (Fig. 3E). As in the dermis, we observed a population of CD3<sup>+</sup> cells with low SSC/FSC parameters overlapping with CD3<sup>+</sup> T cells in some of the animals. These cells are all HLA-DR<sup>+</sup> cells and probably correspond to NK cells (Fig. S2B). Among CD3<sup>+</sup> cells, we found no CD66<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> PMNs in normal epidermis (Fig. 3F). LCs were defined by the high expression level of CD1a. Surprisingly, macaque LCs do not express CD1c (Fig. 3G) whereas human LCs

express this marker (Klechevsky et al., 2008). We verified the expression of CD11c and HLA-DR on these cells, confirming their LC characteristics (Fig. 3H). The LCs resemble the dermal population expressing the  $CD11c^+HLA-DR^+CD1a^+CD1c^-$  phenotype (Fig. 2I). This subset probably resulted from the migration of LCs through the dermis (Henri et al., 2010; Pearton et al., 2010). Nevertheless, we cannot exclude a potential contamination by epidermal cells during the separation of epidermal and dermal sheets.

Neither  $CD14^+$  (Fig. 3I) nor  $CD123^+$  (Fig. 3J) cells were present in normal epidermis. Fig. 3K shows the percentage of each subset isolated at steady state.  $CD3^+$  T lymphocytes and LCs were the two major populations of immune cells present in normal epidermis. The presence of putative NK cells was highly variable; some animals had a large number of this population whereas others had none.

### *3.4. Immune cells in skin draining lymph nodes*

APCs of peripheral tissue are able to take up Ag, self-activate, mature and migrate to proximal draining LNs during the steady state or following infection or Ag administration in the skin (Bursch et al., 2007). We used the same 12-parameter approach that we used for the skin to track skin APCs after their migration into draining LNs in normal conditions (Fig. 4). However, we added anti-CD8 and anti-CD20 Ab in V500 color to identify CD3, CD8, and CD20 lineage (Lin) (Table 1) because LNs contain a large number of T and B lymphocytes. Dead cells (Fig. 4A), debris and most lymphocytes (Fig. 4B) and doublets (Fig. 4C) were excluded according to size and granularity. We then analyzed cells with the same gating strategy used for the dermis (Fig. 4). PMNs were identified as  $CD66^+HLA-DR^-$  cells (Fig. 4F). Similar to skin cells, we could identify two subsets of  $CD1a^+CD1c^-$  and  $CD1a^+CD1c^+$  DCs, both of these populations probably come from the skin. We also observed three populations among  $CD1a^-$  cells (Fig. 4G, 4H, 4I), according to the expression of CD11b and CD14 (Fig. 4J). LN macrophages, isolated in the  $CD11b^+CD14^+$  gate, expressed a phenotype distinct from that of dermal macrophages (Fig. 4K). Indeed, LN macrophages were  $CD11b^{high}$  and showed a moderate expression of CD163. We can assume that these macrophages come from blood (Palframan et al., 2001) or peripheral tissue after their migration via afferent lymphatic vessels (Toichi et al., 2008). As in the dermis, we also observed a small population of  $CD14^+CD11b^+CD123^-CD163^-$  cells. This population could correspond to monocytes that are in the process of differentiating into macrophages. We also identified myeloid resident DCs (mDCs) double positive for CD11c and HLA-DR within the  $CD11b^+CD14^-$  population (Fig. 4L). Finally, we isolated  $CD123^+$  pDCs among  $CD11b^-CD14^-$  cells through their

positive signal in the CD123\_CD163 AF594 channel. The percentage of each subset isolated at steady state is indicated in Figure 4N. In LNs, pDCs were the most abundant APC population followed by macrophages and resident mDCs. CD1a<sup>+</sup> cells, which probably come from the skin, were the least represented DC population.

In summary, we designed a 12-parameter flow cytometry panel that enables the identification of resident lymphocytes, DCs, monocytes/macrophages, and PMNs in the epidermis and dermis as well as migratory DCs in cutaneous draining LNs. Most important, few skin cells are necessary to define the different populations in our protocol, thus avoiding the use of large tissue samples. Our staining protocol may be an important tool to study the effect of skin treatment, skin autoimmune disease, or cutaneous vaccination on immune cell populations. It will also allow a better understanding of the mechanisms involved in skin immunity.

**Acknowledgments**

This work was supported by the *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales* (ANRS, Paris, France), by the National Institute of Health prime award No. 2U19AI057234-06 and by ADITEC project funding from the European Commission (grant FP7-HEALTH-2011-280873). L.A. held fellowships from Sidaction (Paris, France) and the *Fonds Pierre Bergé* (Paris, France). This work benefited from the technical support of the core laboratory (TIPIV) of the Division of Immuno-Virology (CEA), for the immune monitoring of animals and flow cytometry analysis (FlowCyTech). We thank O. Epaulard, C. Poux, P. Rosenbaum, B. Todorova, N. Salabert (Division of Immuno-Virology, CEA) for helpful discussions. We thank C. Joubert and J.M. Helies, veterinary surgeons, for supervision and assistance with animal care.

## References

- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T.H., Williams, K.C., 2010, Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: clarification on DC heterogeneity. *J Immunol Methods* 360, 119-28. doi:10.1016/j.jim.2010.06.017
- Bond, E., Adams, W.C., Smed-Sorensen, A., Sandgren, K.J., Perbeck, L., Hofmann, A., Andersson, J.Lore, K., 2009, Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *J Immunol Methods* 348, 42-56. doi:10.1016/j.jim.2009.06.012
- Brandner, J.M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., Moll, I., 2002, Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 81, 253-63. doi:10.1078/0171-9335-00244
- Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., Hogquist, K.A., 2007, Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* 204, 3147-56. doi:10.1084/jem.20071966
- Cerboni, S., Gentili, M., Manel, N., 2013, Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. *Adv Immunol* 120, 211-37. doi:10.1016/B978-0-12-417028-5.00008-9
- Chodaczek, G., Papanna, V., Zal, M.A., Zal, T., 2012, Body-barrier surveillance by epidermal  $\gamma\delta$  TCRs. *Nat Immunol* 13, 272-82. doi:10.1038/ni.2240
- Chu, C.C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Gryns, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., Peakman, M., Lombardi, G., Nestle, F.O., 2012, Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med* 209, 935-45. doi:10.1084/jem.20112583
- Chu, C.C., Di Meglio, P., Nestle, F.O., 2011, Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 23, 28-41. doi:10.1016/j.smim.2011.01.006
- Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K., Dowgiert, R.K., Kupper, T.S., 2006, The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 176, 4431-9.
- Clark, R.A., Watanabe, R., Teague, J.E., Schlapbach, C., Tawa, M.C., Adams, N., Dorosario, A.A., Chaney, K.S., Cutler, C.S., Leboeuf, N.R., Carter, J.B., Fisher, D.C., Kupper, T.S., 2012, Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune



- protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med* 4, 117ra7.  
doi:10.1126/scitranslmed.3003008
- Conrad, C., Meller, S., Gilliet, M., 2009, Plasmacytoid dendritic cells in the skin: to sense or not to sense nucleic acids. *Semin Immunol* 21, 101-9.  
doi:10.1016/j.smim.2009.01.004
- Dutertre, C.A., Jourdain, J.P., Rancez, M., Amraoui, S., Fossum, E., Bogen, B., Sanchez, C., Couedel-Courteille, A., Richard, Y., Dalod, M., Feuillet, V., Cheynier, R., Hosmalin, A., 2014, TLR3-Responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8alpha+-Equivalent Dendritic Cells Uncovered in Healthy and Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. *J Immunol* 192, 4697-708. doi:10.4049/jimmunol.1302448
- Ebert, L.M., Meuter, S., Moser, B., 2006, Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol* 176, 4331-6.
- Elias, P.M., Matsuyoshi, N., Wu, H., Lin, C., Wang, Z.H., Brown, B.E., Stanley, J.R., 2001, Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. *J Cell Biol* 153, 243-9.
- Fujita, H., Nogales, K.E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J.A., Krueger, J.G., 2009, Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21795-800. doi:10.1073/pnas.0911472106
- Furio, L., Briotet, I., Journeaux, A., Billard, H., Peguet-Navarro, J., 2010, Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol* 130, 1345-54. doi:10.1038/jid.2009.424
- Gao, Y., Nish, S.A., Jiang, R., Hou, L., Licona-Limon, P., Weinstein, J.S., Zhao, H., Medzhitov, R., 2013, Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* 39, 722-32. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.028
- Gardner, M.B., Luciw, P.A., 2008, Macaque models of human infectious disease. *Ilar J* 49, 220-55.
- Geherin, S.A., Fintushel, S.R., Lee, M.H., Wilson, R.P., Patel, R.T., Alt, C., Young, A.J., Hay, J.B., Debes, G.F., 2012, The skin, a novel niche for recirculating B cells. *J Immunol* 188, 6027-35. doi:10.4049/jimmunol.1102639
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., Hilkens, C., Merad, M., Collin, M., 2009, Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* 206, 371-85.  
doi:10.1084/jem.20081633

- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K., Gehring, A., Bertoletti, A., Collin, M., Ginhoux, F., 2012, Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37, 60-73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012
- Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guillems, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., Malissen, B., 2010, CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207, 189-206. doi:10.1084/jem.20091964
- Herodin, F., Thullier, P., Garin, D., Drouet, M., 2005, Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. *Eur Cytokine Netw* 16, 104-16.
- Hume, D.A., 2008, Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 181, 5829-35.
- Iijima, N., Mattei, L.M., Iwasaki, A., 2011, Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 284-9. doi:10.1073/pnas.1005201108
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J.R., Belkaid, Y., Ma'ayan, A., Riches, D.W., Yokoyama, W.M., Ginhoux, F., Henson, P.M., Randolph, G.J., 2013, Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599-610. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007
- Jiang, X., Clark, R.A., Liu, L., Wagers, A.J., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S., 2012, Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227-31. doi:10.1038/nature10851
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J., Hart, D.N., Radford, K.J., 2010, Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207, 1247-60. doi:10.1084/jem.20092140

- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H., 2000, Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-22.
- Ju, X., Clark, G., Hart, D.N., 2010, Review of human DC subtypes. *Methods Mol Biol* 595, 3-20. doi:10.1007/978-1-60761-421-0\_1
- Kapsenberg, M.L., 2003, Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984-93. doi:10.1038/nri1246
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., Reiter, Y., Banchereau, J., Ueno, H., 2008, Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.013
- Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J.S., Laidlaw, B.J., Craft, J.E., Iwasaki, A., 2013, CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 39, 733-43. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.029
- Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C., 2004, Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 4, 211-22. doi:10.1038/nri1310
- Lenz, A., Heine, M., Schuler, G., Romani, N., 1993, Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest* 92, 2587-96. doi:10.1172/JCI116873
- Li, D., Romain, G., Flamar, A.L., Duluc, D., Dullaers, M., Li, X.H., Zurawski, S., Bosquet, N., Palucka, A.K., Le Grand, R., O'Garra, A., Zurawski, G., Banchereau, J., Oh, S., 2012, Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J Exp Med* 209, 109-21. doi:10.1084/jem.20110399
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013, The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31, 563-604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Morita, K., Miyachi, Y., Furuse, M., 2011, Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol* 21, 12-7. doi:10.1684/ejd.2010.1192
- Murakami, R., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Hattori, M., Irimura, T., 2013, A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One* 8, e73270. doi:10.1371/journal.pone.0073270

- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z.Nickoloff, B.J., 2009, Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 679-91. doi:10.1038/nri2622
- Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A.Nickoloff, B.J., 1993, Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151, 6535-45.
- Ochoa, M.T., Loncaric, A., Krutzik, S.R., Becker, T.C.Modlin, R.L., 2008, "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol* 128, 2225-31. doi:10.1038/jid.2008.56
- Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A.von Andrian, U.H., 2001, Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 194, 1361-73.
- Pearnton, M., Kang, S.M., Song, J.M., Anstey, A.V., Ivory, M., Compans, R.W.Birchall, J.C., 2010, Changes in human Langerhans cells following intradermal injection of influenza virus-like particle vaccines. *PLoS One* 5, e12410. doi:10.1371/journal.pone.0012410
- Romain, G., van Gulck, E., Epaulard, O., Oh, S., Li, D., Zurawski, G., Zurawski, S., Cosma, A., Adam, L., Chapon, C., Todorova, B., Banchereau, J., Dereuddre-Bosquet, N., Vanham, G., Le Grand, R.Martinon, F., 2012, CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur J Immunol* 42, 2019-30. doi:10.1002/eji.201242478
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M.Kupper, T.S., 2012, Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36, 873-84. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.018
- Shimizu, H. 2007 Shimizu's textbook of dermatology. Department of Dermatology Hokkaido University. <http://www.derm-hokudai.jp/shimizu-dermatology/>
- Steinman, R.M.Witmer, M.D., 1978, Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-6.
- Stoitzner, P., Romani, N., McLellan, A.D., Tripp, C.H.Ebner, S., 2010, Isolation of skin dendritic cells from mouse and man. *Methods Mol Biol* 595, 235-48. doi:10.1007/978-1-60761-421-0\_16
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B.Henri, S., 2013, Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and

- monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925-38.  
doi:10.1016/j.immuni.2013.10.004
- Toichi, E., Lu, K.Q., Swick, A.R., McCormick, T.S.Cooper, K.D., 2008, Skin-infiltrating monocytes/macrophages migrate to draining lymph nodes and produce IL-10 after contact sensitizer exposure to UV-irradiated skin. *J Invest Dermatol* 128, 2705-15.  
doi:10.1038/jid.2008.137
- Valladeau, J.Saeland, S., 2005, Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 17, 273-83.  
doi:10.1016/j.smim.2005.05.009
- van Spriel, A.B.de Jong, E.C., 2013, Dendritic cell science: more than 40 years of history. *J Leukoc Biol* 93, 33-8. doi:10.1189/jlb.0512263
- Villablanca, E.J.Mora, J.R., 2008, A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol* 38, 2975-80. doi:10.1002/eji.200838919
- von Bubnoff, D., Andres, E., Hentges, F., Bieber, T., Michel, T.Zimmer, J., 2010, Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol* 125, 60-8. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.020
- Yan, G., Zhang, G., Fang, X., Zhang, Y., Li, C., Ling, F., Cooper, D.N., Li, Q., Li, Y., van Gool, A.J., Du, H., Chen, J., Chen, R., Zhang, P., Huang, Z., Thompson, J.R., Meng, Y., Bai, Y., Wang, J., Zhuo, M., Wang, T., Huang, Y., Wei, L., Li, J., Wang, Z., Hu, H., Yang, P., Le, L., Stenson, P.D., Li, B., Liu, X., Ball, E.V., An, N., Huang, Q., Fan, W., Zhang, X., Wang, W., Katze, M.G., Su, B., Nielsen, R., Yang, H.Wang, X., 2011, Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques. *Nat Biotechnol* 29, 1019-23.  
doi:10.1038/nbt.1992
- Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Steinman, R.M., Krueger, J.G.Lowes, M.A., 2007, Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest* 117, 2517-25. doi:10.1172/JCI32282

**Table 1.** Flow cytometry panel to study immune cell populations in skin and LNs of cynomolgus macaques

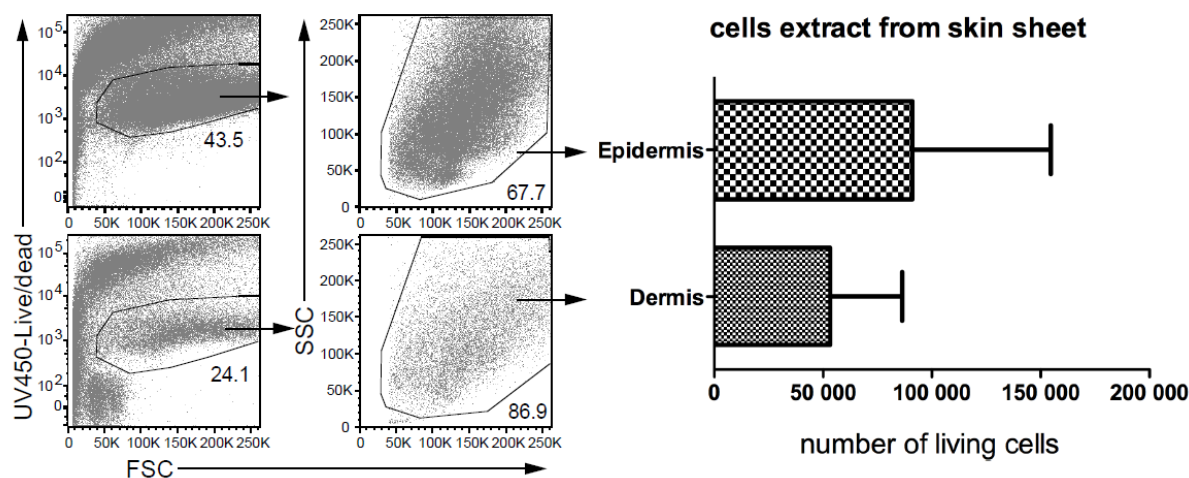
Specificity	Fluorochrome	Clone	Supplier <sup>a</sup>	Quantity per sample
Live / Dead	UV450		Life Technologies	1 µl/ml
CD1a	AF-700 <sup>b</sup>	O10	Dako	0.5 µg
CD11c	APC	S-HCL3	BD	2 µl
CD14	APC-H7	M5E2	BD	5 µl
CD66abce	FITC	TET2	Miltenyi	2 µl
CD1c	PE	AD5-8E7	Miltenyi	5 µl
CD11b	PE-Cy7	Bear 1	Beckman Coulter	2 µl
CD163	AF-594	GHI/61	BD	0.5 µg
CD123	AF-594	7G3	BD	1 µg
HLA-DR	PerCP	L243	BD	2 µl
CD45	V-450	DO58-1283	BD	2 µl
CD3 <sup>c</sup>	V-500	SP34-2	BD	5 µl
CD8 <sup>c</sup>	V-500	RPA-T8	BD	5 µl
CD20 <sup>c</sup>	V-500	L27	BD	5 µl

<sup>a</sup> Life Technologies, Saint Aubin, France; Dako, Les Ulis, France; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France ; Miltenyi Biotec SAS, Paris, France ; Beckman coulter, Villepinte, France

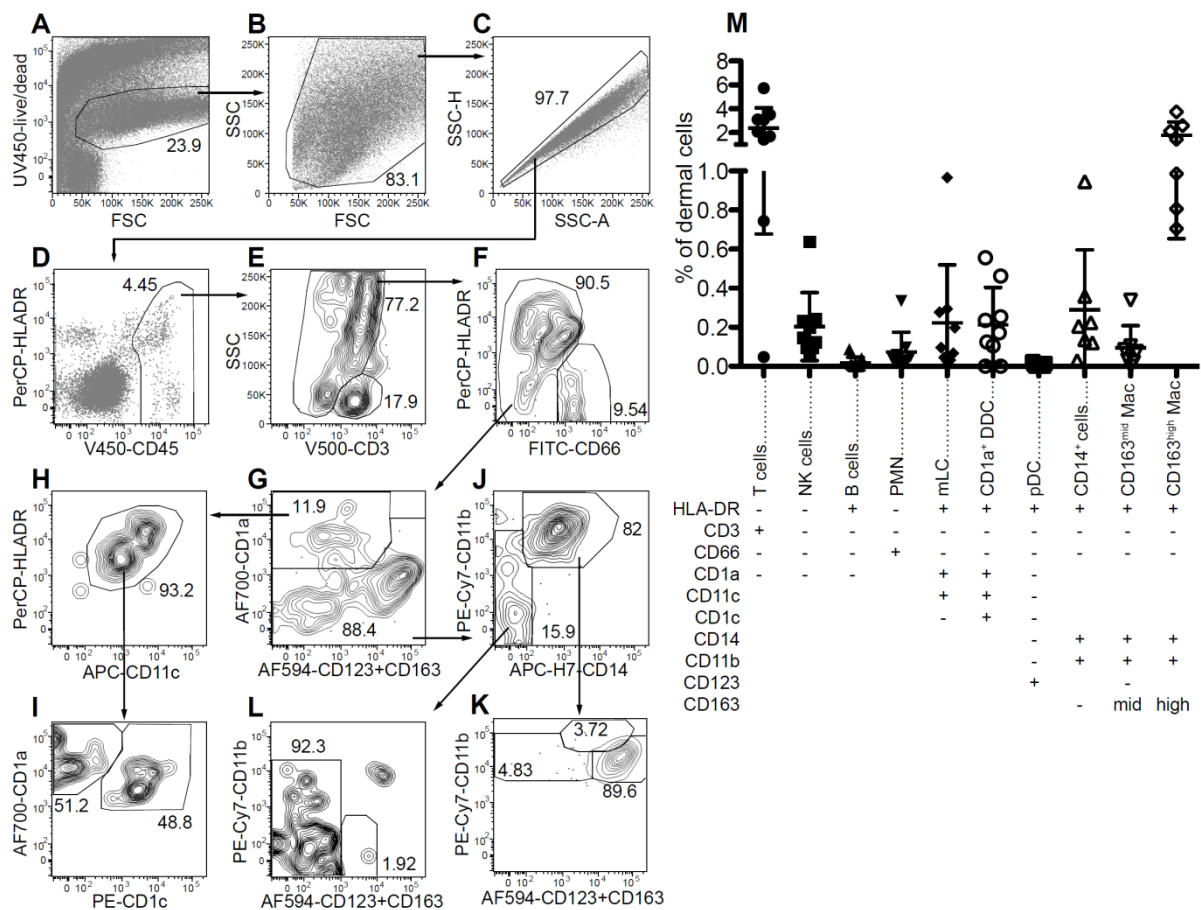
<sup>b</sup> Fluorochrome abbreviations: APC: allophycocyanin; FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; Cy7: Cyanine-7; PerCP: Peridin-chlorophyll; AF: Alexa-Fluor

<sup>c</sup> LN samples were analyzed with 3 Ab (anti-CD3, -CD8, -CD20) coupled to V-500 fluorochrome whereas skin samples were analyzed with the anti-CD3 V500 only.

## Figures and legends

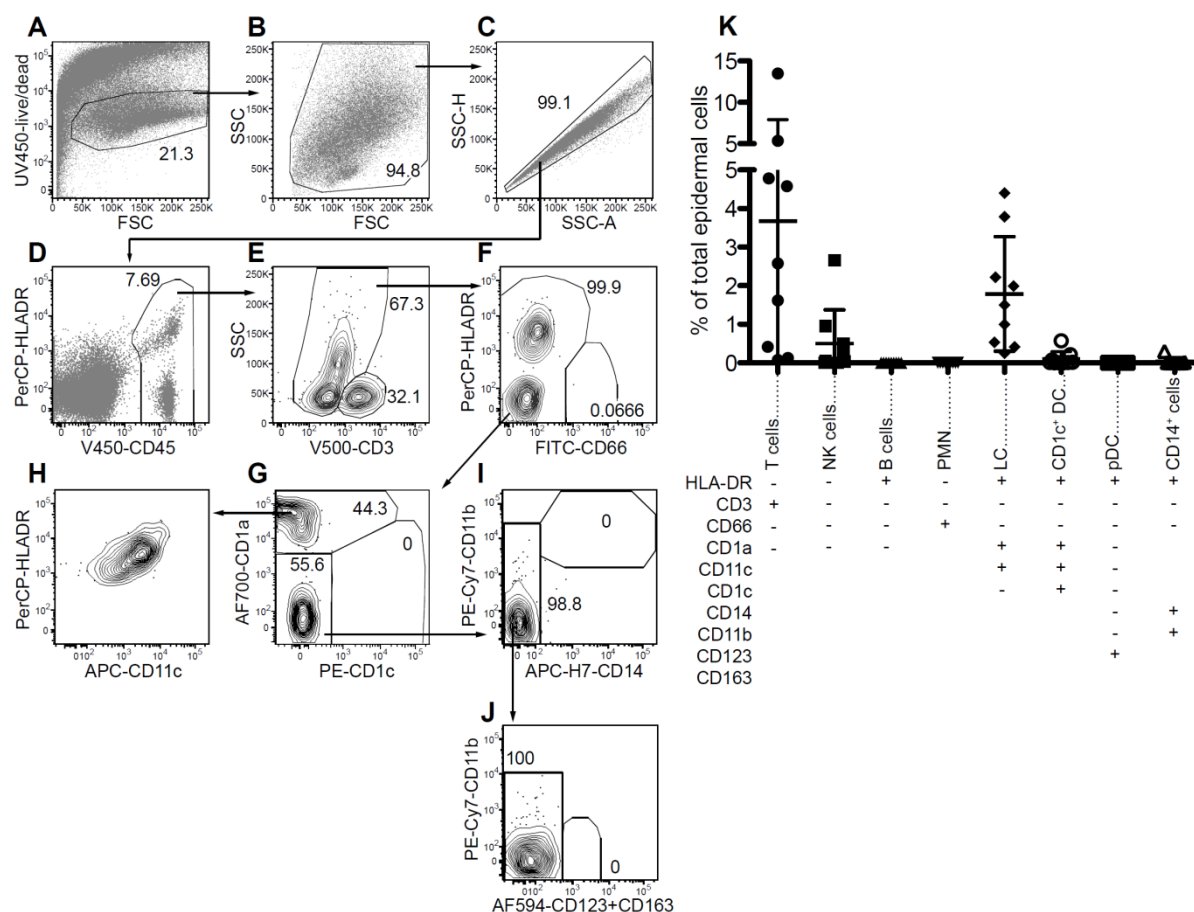


**Fig. 1.** Quantification of cells extracted from skin biopsy. Epidermis and dermis sheets were separated by dispase treatment from 8mm skin biopsies. Then, the sheets were incubated with collagenase (dermis) or collagenase + trypsin (epidermis) and were dissociated mechanically to obtain cell suspensions. (A) Cell suspensions were analyzed by flow cytometry to assess the number of living cells per sheet. (B) Living cells extracted from each sheet were quantified and plotted as mean  $\pm$  SD (n=45).

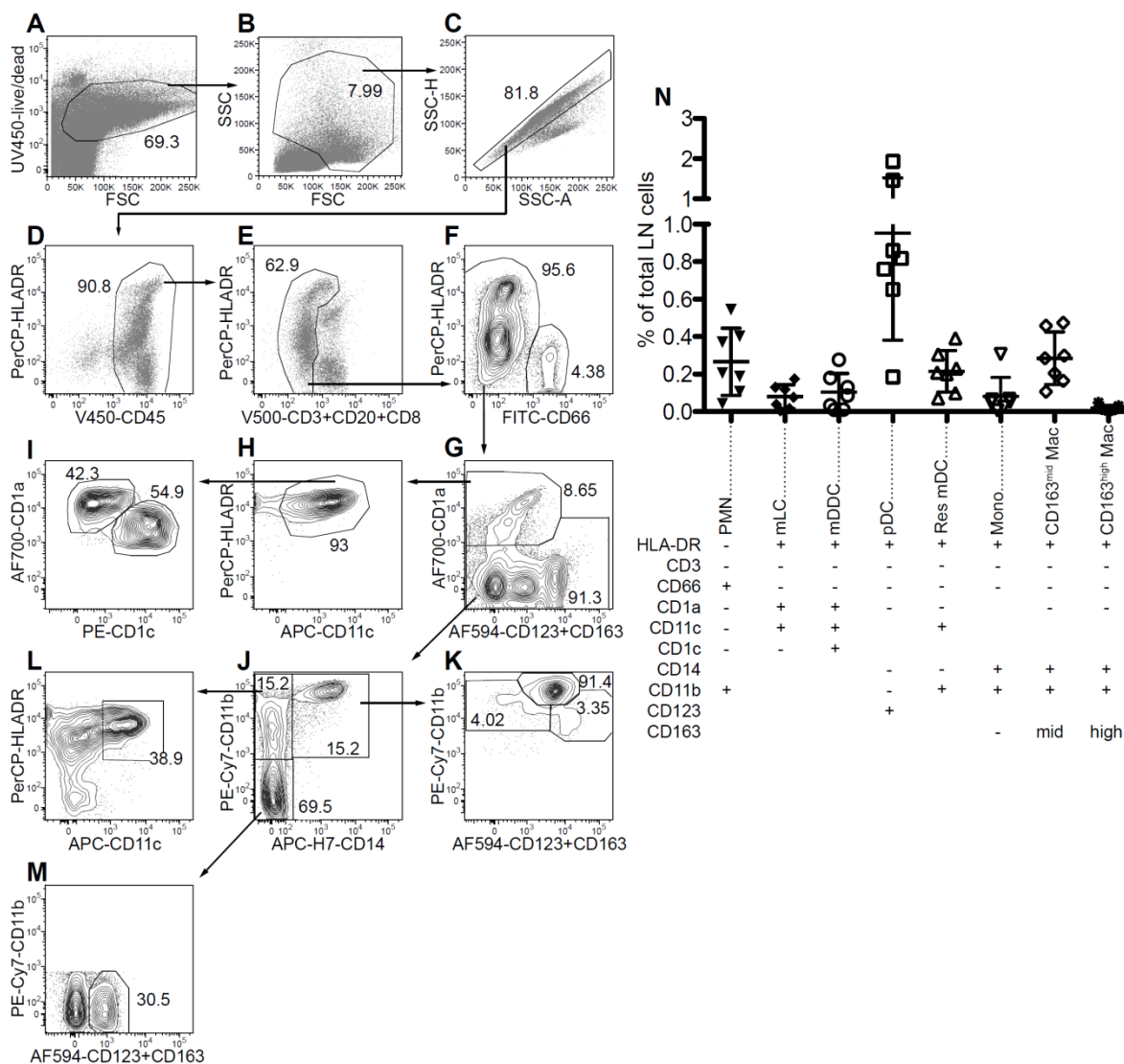


**Fig. 2.** Characterization of dermal immune cells by multiparameter flow cytometry. Cells extracted from normal macaque dermis were used to study immune cell populations with the 12-parameter Ab mix by flow cytometry (A-L). The gating strategy is illustrated by one representative animal (n=9). The percentage of each subset isolated is indicated  $\pm$  SD as well as the percentage of putative NK and B cells subsets. CD14<sup>+</sup> cells correspond to putative monocytes or CD14<sup>+</sup> DDC (M). Abbreviation: Mac, macrophages.





**Fig. 3.** Characterization of epidermal immune cells by multiparameter flow cytometry. Cells extracted from normal macaque epidermis were used to study immune cell populations with the 12-parameter Ab mix by flow cytometry (A-J). The gating strategy is illustrated by one representative animal per condition (n=9). The percentage of each subset isolated is indicated  $\pm$  SD as well as the percentage of putative NK and B cells subsets. CD14<sup>+</sup> cells correspond to monocytes or macrophages (L). Abbreviations: Mono, monocytes; Mac, macrophages.



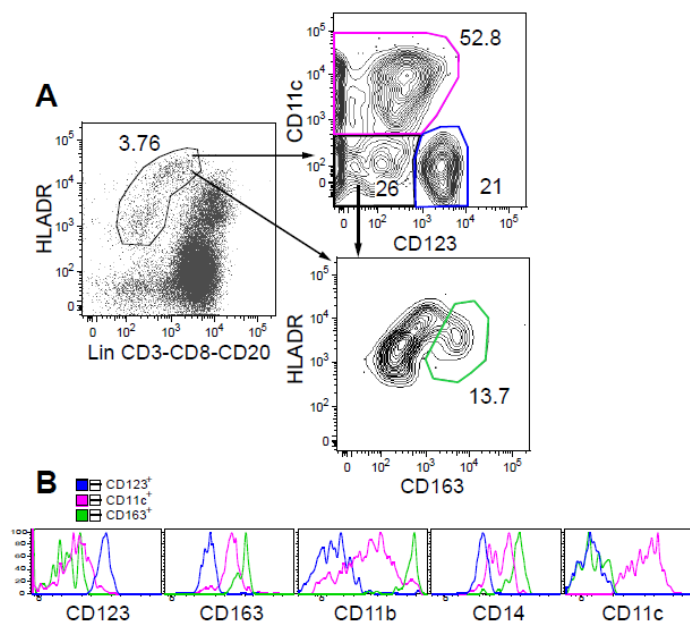
**Fig. 4.** Identification of APCs in skin draining lymph nodes by multiparameter flow cytometry. A total of  $5.10^6$  of cells extracted from macaque skin draining LNs at steady state were used to study non-lymphocyte populations with the 12-parameter Ab mix by flow cytometry (A-M). The gating strategy is illustrated by one representative animal (n=7). The percentage of each subset isolated is indicated  $\pm$  SD (N). Abbreviations: Res, resident; Mono, monocytes; Mac, Macrophages.

Supplementary Table S1: Compensation matrix

	AF-700	APC	APC-H7	FITC	PE	PE-Cy7	AF-594	PerCP	UV450	V-450	V-500
AF-700		4.539	11.18	0	0	4.8	0.1054	1.349	0	0	0
APC	14.89		1.802	0	0	1.149	0.07873	0.4044	0	0	0
APC-H7	12.52	7.538		0	0	53.56	0.4089	0.1552	0.13	0	0
FITC	0	0	0		0	0.05672	0	5.892	0.5579	0.06803	13.51
PE	0	0	0	0.1391		0.8535	60.56	7.007	0	0	0
PE-Cy7	0.4918	0.1975	1.842	0	4.535		2.924	0.8809	0	0	0
AF-594	0.4917	2.75	0.09269	0	10.84	4.946		3.32	0	0	0.1545
PerCP	5.251	42.59	0.811	0	0	4.891	0		0	0	0
UV450	0.08669	0.1742	0	0.2528	0.1595	0.07845	0.2621	0.3021		15.33	2.543
V-450	0	0	0	0	0	0	0	0	3.271		19.8
V-500	0	0.0581	0	1.321	0	0	0.145	0.2129	0.258	8.024	

Compensation matrix obtained by staining antibody-capture beads (Compbeads) with each mAb used in the protocol, with the exception of live/dead staining carried out on cells. Spectra overlap or spillover between fluorochromes was calculated with FlowJo 9.7.1 software.

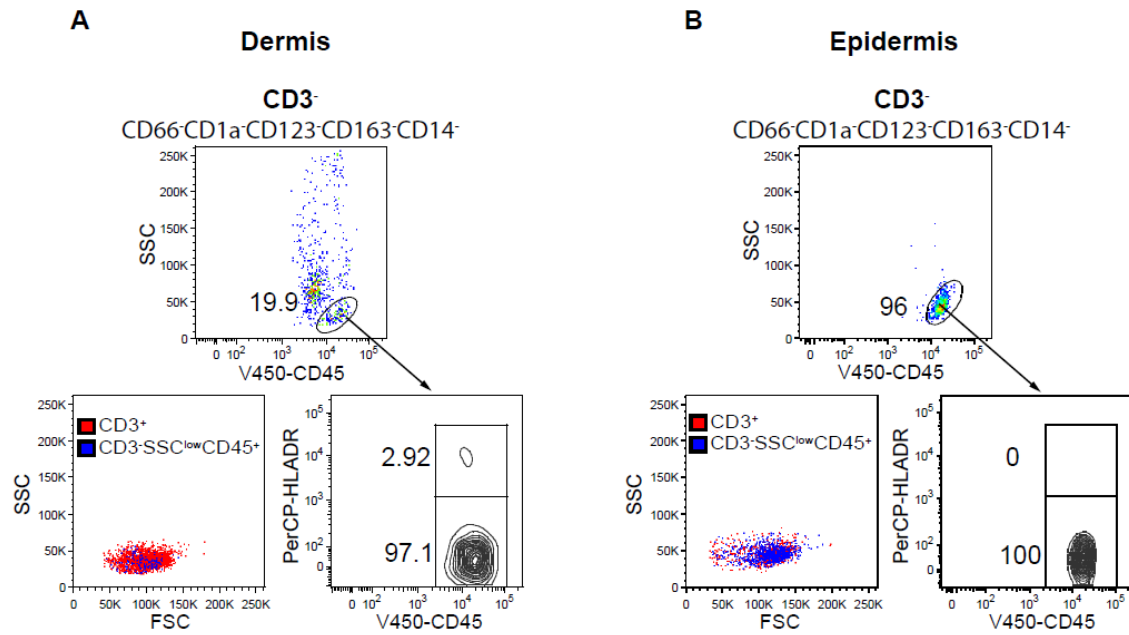
Fluorochrome abbreviations: APC: allophycocyanin; FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; Cy7: Cyanine-7; PerCP: Peridin-chlorophyll; AF: Alexa-Fluor



### Supplementary Fig1.

#### Macrophages and pDC exclusively express CD11b and CD14.

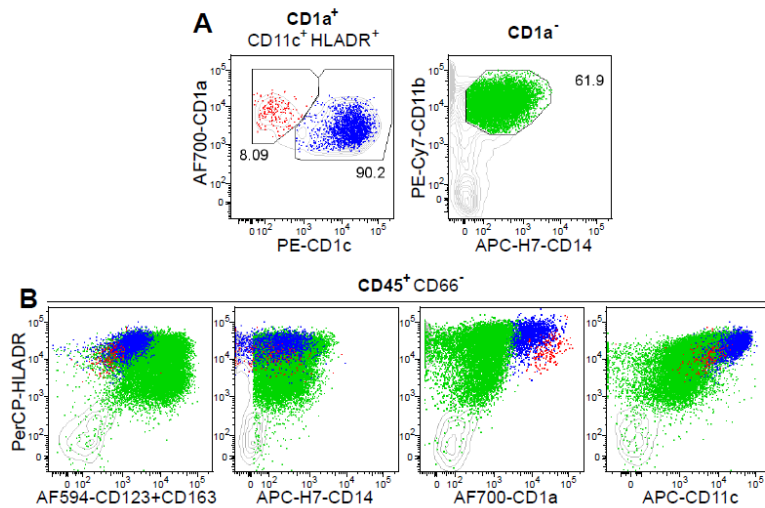
APCs were isolated from healthy skin draining LNs according to their expression of HLA-DR and to their lack of expression of CD3, CD20 and CD8. CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup> mDC (pink), CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> pDC (blue) and CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> macrophages (green) were gated (A) and were analyzed for their level expression of CD123, CD14, CD11b and CD163 markers (B).



## Supplementary Fig 2.

### Potential presence of NK cells in healthy skin

A fraction of uncharacterized resting skin cells extracted from the dermis (A) or the epidermis (B) were negative for CD66, CD1a, CD123, CD163 and CD14 and showed a high expression of CD45 and low granularity. These resting cells (blue) have a similar morphology to that of CD3<sup>+</sup> T cells (red) and were analyzed for their HLA-DR expression (A and B).



**Supplementary Fig 3.**

**Importance of gating strategy used to isolated APCs in the dermis**

CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> (red), CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> (blue) and CD14<sup>+</sup> (green) populations in the dermis (A) show overlapping expression of CD123\_CD163, CD14, CD1a, and CD11c markers (B).

### **Article 3 : Dynamics of local immune response induce by intradermal auxoGTUmultiSIV DNA vaccine in association with local electroporation**

Lucille Adam, Biliana Todorova, Candice Poux, Pierre Rosenbaum, Mart Ustav, Nathalie Bosquet, Roger Legrand et Frédéric Martinon

Article en préparation pour « The Journal of Immunology ».

Ce manuscrit a pour objectif de comprendre certains des mécanismes impliqués dans la mise en place d'une réponse vaccinale efficace. En effet, un nombre croissant de travaux suggèrent le rôle essentiel des acteurs de l'immunité innée dans l'orientation et l'induction d'une réponse immunitaire puissante, persistante et protectrice. Nous avons donc étudié, chez le macaque cynomolgus, les réponses précoces induites localement au niveau du site d'injection du vaccin ADN auxoGTUmultiSIV administré par voie i.d en association avec une EP locale.

Nous avons en premier lieu identifié et caractérisé les différentes populations de cellules immunitaires présentes en conditions basales. Nous avons montré que l'épiderme contient des cellules de Langerhans exprimant fortement le CD1a, HLA-DR et le CD207 ainsi qu'une population de lymphocytes CD3<sup>+</sup> intraépithéliaux. Le derme est plus riche en populations de cellules immunitaires, que nous avons identifiées sur la base d'une forte expression du CD45. Les DC dermales CD1a<sup>+</sup> peuvent être subdivisées en deux populations, l'une CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>, l'autre CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>; Toutes deux expriment le CD11c et le CD207. Les macrophages sont CD14<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>high</sup> et expriment faiblement le CD11c. Le derme contient également une importante proportion de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>. De rares granulocytes HLADR<sup>-</sup>CD66<sup>+</sup> peuvent également être présents dans le derme à l'état basal.

Les travaux précédents du laboratoire ont montré l'importance de l'EP dans l'intensité de la réponse immune obtenue suite à la vaccination (Martinon et al., 2009). Nous avons donc choisi d'étudier la réponse locale suite à la vaccination associée à une EP du site d'injection (ADN+EP). Nous avons comparé le site vacciné à un site injecté par du PBS également associé à une EP locale (PBS+EP). La comparaison entre ces deux conditions à un site non traité, nous a permis de mettre en évidence la part respective de l'EP et de l'ADN dans la réponse locale.

Nous avons mis en évidence un pic de recrutement de populations cellulaires inflammatoires infiltrant le derme et l'épiderme 24h post injection+EP. Ces populations correspondent à des granulocytes et des populations de cellules CD14<sup>+</sup>. Parmi ces cellules CD14<sup>+</sup> recrutées, une sous-population exprime le CD11b mais pas le CD163, un phénotype proche des monocytes sanguins. La seconde population exprime fortement le CD11b mais plus modérément le CD163 par rapport aux

macrophages résidants de la peau. De plus, ces macrophages recrutés n'expriment pas le CD206 ou le CD40, contrairement aux macrophages résidants. En revanche, ils expriment modérément le CD86, confirmant ainsi que ces 2 types de macrophages sont distincts.

Plus spécifiquement, dans l'épiderme nous avons mis en évidence une augmentation transitoire du nombre de LC, associée à leur activation, comme le montre leur surexpression du CD86, du CD83 et d'HLA-DR. Nous avons ensuite observé une diminution significative des LC suggérant que les cellules activées à 24h ont quitté l'épiderme pour migrer vers les nœuds lymphatiques drainants. Toujours dans l'épiderme, le recrutement de cellules de type DC inflammatoires CD1c<sup>+</sup> qui expriment des niveaux intermédiaires de CD1a, a été observé. Le nombre de ces cellules est significativement augmenté 72h post injection plus EP et ce du côté PBS+EP comme du côté ADN+EP. Ces cellules sont distinctes des LC car elles n'expriment pas le CD207 en surface. Elles correspondent à une population de DC inflammatoires épidermiques déjà identifiée par d'autres équipes et connues sous le nom d'« inflammatory Dendritic epidermal cell » (IDEC) (Wollenberg et al., 1996). Cependant une faible proportion de ces cellules montre une expression du CD207 en intracellulaire indiquant que ces cellules peuvent acquérir les caractéristiques de LC et pourraient correspondre à des précurseurs de LC.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les côtés injectés par du PBS et par l'ADN, excepté pour les granulocytes qui sont recrutés de manière plus importante du côté ADN que du côté PBS dans le derme. Ces résultats suggèrent l'importance de l'EP dans le processus inflammatoire et un rôle mineur de la présence de l'ADN dans ce processus.

Bien que nous n'ayons pas mis en évidence de différence significative entre les côtés PBS+EP et ADN+EP, excepté pour les granulocytes dans le recrutement des populations inflammatoires, une différence est observée au niveau du microenvironnement. En effet le niveau de production de facteurs solubles tels que MCP-1, IL-18, MIP1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, impliqués dans le processus inflammatoire et le recrutement de cellules inflammatoires, est plus important du côté ADN+EP que du côté PBS+EP. Ces augmentations sont détectées dès 24h. Un environnement anti-inflammatoire se met également en place dès 24h post vaccination comme le montre la présence d'IL-1RA et CD40L soluble.

Ces résultats illustrent les mécanismes cellulaires et moléculaires précoces mis en place par notre stratégie de vaccination. Ils démontrent le rôle crucial de l'EP dans le processus inflammatoire, en plus de son rôle essentiel pour augmenter la quantité d'Ag synthétisé au niveau local. Le vaccin ADN semble pour sa part influencer d'avantage le microenvironnement et induire la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires nécessaires au recrutement et à l'activation cellulaire.



## Dynamics of local immune response induced by intradermal auxoGTUmultiSIV DNA vaccine in association with local electroporation

**Running title:** Skin immune response to DNA vaccine with electroporation

### Authors

Lucille Adam,<sup>\*,†,‡</sup> Biliana Todorova,<sup>\*,†,‡</sup> Candice Poux,<sup>\*,†,‡</sup> Pierre Rosenbaum,<sup>\*,†,‡</sup> Mart Ustav,<sup>§</sup> Nathalie Dereuddre-Bosquet,<sup>\*,†,‡</sup> Roger Le Grand,<sup>\*,†,‡</sup> and Frédéric Martinon<sup>\*,†,‡,||,#</sup>

### Affiliations

\* CEA, Division of Immuno-Virology, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

† UMR E1, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

‡ Vaccine Research Institute (VRI), 94010 Créteil, France.

§ Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia

|| Inserm, 75014 Paris, France.

# Correspondence to Dr Frédéric Martinon, CEA, Division of Immuno-Virology, iMETI, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: [frederic.martinon@cea.fr](mailto:frederic.martinon@cea.fr)

## Grant support

This work was supported by the *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales* (ANRS, Paris, France), by the National Institutes of Health prime award No. 2U19AI057234-06 and by ADITEC project funding by the European Commission (grant FP7-HEALTH-2011-280873). L.A. held fellowships from Sidaction (Paris, France) and the *Fonds Pierre Bergé* (Paris, France).

## Abbreviations used in this article

DC, dendritic cell; DDC, dermal DC; EP, electroporation; GTU, gene transport unit; i.d., intradermal; IDEC, inflammatory dendritic cell LC, Langerhans cell; LN, lymph node; M1, type 1 macrophages; M2, type 2 macrophages; mLC, migratory LC; NHP, nonhuman primate.

**Abstract**

Mechanisms involved in early vaccine response are poorly understood. Skin is an interesting target for vaccine delivery because of its richness in antigen presenting cells (APC). The intradermal delivery of auxoGTUmultiSIV DNA vaccine was shown to induce strong and persistent immune responses, especially in association with electroporation in cynomolgus macaque.

In this work, we demonstrate a recruitment of granulocytes and inflammatory monocytes/macrophages in epidermis and dermis, as well as a population of inflammatory dendritic epithelial cell (IDEC) in epidermis after vaccination. In epidermis, 24h after treatment, we observed an initial increase of LC with an up-regulation of HLA-DR, CD86 and CD83, demonstrating their maturation. Between 24h and 72h, LC number decreased, suggesting that mature LC has leaved epidermis to migrate to skin draining lymph node. All these cellular events were almost due to EP process, independently of DNA vaccine presence. The skin microenvironment reveals a release of pro-inflammatory soluble factors, as MCP-1, IL-18, IL-15, IL-8 and anti-inflammatory mediators as IL1RA and sCD40L by 24h, all considerably enhanced in the presence of DNA.

Our results suggest that EP, independently of the presence of DNA, is sufficient to induce cells mobilization and DC maturation at the vaccinated site, suggesting an important adjuvant effect of EP. However, it seems that DNA is required to generate a favorable microenvironment essential for correct APC activation. This work provides important clues to local inflammation mechanisms and opens up new possibilities for vaccine strategies.

## Introduction

Vaccination is the most efficient method to protect human and animal against infections or diseases (Koup and Douek, 2011).

Among numerous vaccination strategies, the use of live attenuated vaccines presents the best efficiency and allows obtaining strong humoral and cellular immune responses with long-term memory (Gaucher et al., 2008; Zheng et al., 2012). Nevertheless, it requires the manipulation and administration of infectious agents causing the problem of safety (Baba et al., 1999). DNA-based vaccines are an interesting alternative. They have some advantages compare to other vaccination strategies as proteins encoded mimics the expression of antigen after viral infection (Shedlock and Weiner, 2000). Therefore, this strategy reproduces advantages of live attenuated vaccines without the necessity to administrate infectious agents, and induces immune responses (Cardoso et al., 1996; Tang et al., 1992; Ulmer et al., 1993). However, DNA vaccination in human and non-human primates (NHP), a relevant model to study HIV infection and vaccination (Hu, 2005; Gardner and Luciw, 2008), appears to be poorly efficient (Hutnick et al., 2011; Liu et al., 2006; Casimiro et al., 2003b) despite good results obtained in small laboratory animals (Cardoso et al., 1996; Kodihalli et al., 1999). New methods recently developed to improve DNA delivery (Ferraro et al., 2011; Hutnick et al., 2011), as the *in vivo* electroporation (EP), have improved the immune response induced by DNA vaccination (Hirao et al., 2010; Martinon et al., 2009; Rosati et al., 2008).

In a previous work, we have shown the immunogenicity of the auxoGTU DNA-based vaccine against HIV in cynomolgus macaques (Martinon et al., 2009). The particular design of this plasmid permits its attachment to mitotic chromatin during cell division, through the presence of E2 gene from bovine papilloma virus, allowing its preservation in nucleus cells over time (Krohn et al., 2005; Djuranovic et al., 2004). AuxoGTU plasmid induces a better *in vitro* antigen production compare to the same plasmid construction without E2 (Krohn et al., 2005). Additionally, strong and persistent cellular responses in vaccinated animal, particularly with EP realized at the injection site, were observed (Martinon et al., 2009).

In spite of the important number of vaccines used nowadays, mechanisms which are taking place after immunization to allow protection remain poorly understood (Pulendran and Ahmed, 2011). Some studies suggest that early events after vaccination, where innate immunity operates, are critical for the vaccine efficiency (Seneschal et al., 2012; Duffy et al.,

2012; Querec et al., 2006). Notably, it was demonstrated *in vitro* that the orientation of immune responses could be different according to antigen presenting cells (APC) involved in the presentation of antigen to T cells (Klechevsky et al., 2008; Haniffa et al., 2012) and the innate immune sensor involved in recognition of Ag (Li et al., 2012).

The skin is an attractive organ for vaccine delivery because various subtypes of immune cells, and importantly APC, are already present at steady state (Chu et al., 2011). In human, Langerhans cells (LC) are unique APC present in the epidermis. These cells express high levels of CD1a, HLA-DR and langerin (CD207) (Klechevsky et al., 2008) which contributes to the Birbeck granule formation, a unique cytosolic structure in LC (Valladeau and Saeland, 2005; Birbeck et al., 1961). In contrast, the dermis contains at least two populations of dendritic cells (DC) that have been described according to their exclusive expression of CD1a and CD14 (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993; Valladeau and Saeland, 2005; Klechevsky et al., 2008). No CD207 positive populations have been described in human dermis on the contrary of mouse dermis (Henri et al., 2010; Bursch et al., 2007; Takahara et al., 2002). A population of resident macrophages expressing CD163 is also present in normal human dermis (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008). It is important to note that the protocol used to extract immune cells from skin can modify results obtained (Chu et al., 2011). Protocols using migration methods allow obtaining a good yield in DC proportion. However, cells are activated by the process of migration and only cells able to migrate can be retrieved (Haniffa et al., 2009; Klechevsky et al., 2008). Noteworthy, macrophages are not represented in cell suspensions obtained after migration (Haniffa et al., 2009). Another method consists to enzymatically digest the skin which allows obtaining all cells population in a less activated state and resident macrophages (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008).

Here we describe immune cells composing the cynomolgus macaque skin, with a particular interest for APC. Then we analyzed early cellular events involved after intradermal (i.d) injection with the DNA auxoGTU vaccine in association with EP. We show that, in addition to increase the expression of the plasmid-encoded antigens (Martinon et al., 2009), EP induces the local recruitment of inflammatory cells and triggers APC. Both these characteristics may participate to the increased immunogenicity of DNA vaccine delivered in association with EP. In addition, this study gives insights on the early innate responses to vaccines and participates at the better understanding of mechanisms contributing to the establishment of strong and persistent cellular responses obtained by this vaccination strategy.

## Materials and Methods

### *Animals*

Adult male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) imported from Mauritius and weighing 4-9Kg, were housed in CEA facilities (accreditation number: B 92-032\_02) and handled (investigator accreditation no.: RLG, B 92-073; FM, C 92-241) in accordance with European guidelines for non-human primate (NHP) care (EU Directive N 2010/63/EU). Before the start of the study, animals were tested and found to be seronegative for several pathogens (SIV, STLV, filovirus, HBV, herpes B and measles). Animals were sedated with ketamine chlorhydrate (10–20 mg/kg, Rhone-Mérieux, Lyon, France) at 10% of acepromazine (Vtranquil, Ceva Santé Animale, France) during handling. This study was approved by the regional animal care use committee (*Comité Régional d’Ethique Ile de France Sud*, reference 11\_013).

### *Vaccination and biopsies*

DNA auxoGTUmultiSIV vaccine was obtained from FitBiotec (Tempera, Finland). The vaccine was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco life Technologies, Paisley, UK) to a final concentration of 1mg/ml. Macaques were immunized with auxo-GTU-multiSIV plasmid by i.d injection of 100µl vaccine formulation or PBS as control, via a 29-gauge needle (Myjector 1ml, terumo, Leuven, Belgium). A portable pulse generator (CUIY21 EDIT; Nepa Gene, Ichikawa, Chiba, Japan) and tweezers electrodes were used, with a conductive gel to ensure good contact between the electrodes and skin, to perform an electroporation (EP) of injection sites. EP consisted of six successive 10-msec square-wave pulses, output current 300-600mA, with 90-msec intervals between pulses. These parameters were tested previously in a small pilot experiment and found to cause no tissue damage and to increase uptake of reporter plasmid into skin cells. Skin biopsies (8mm in diameter) were realized on anesthetized animals 1, 3 or 8 days after injection.

### *Cells extraction*

Cells were extracted from fresh skin specimens with modified versions of published protocols (Bond et al., 2009; Stoitzner et al., 2010). Briefly, the subcutaneous fat was removed and the specimen was then incubated with 4mg/ml of bacterial protease dispase II (Roche Diagnostic,

Meylan, France) in PBS with 1% of penicillin, streptomycin and neomycin (Gibco life technologies) and 1% of fungizone (Amphotericin B, Gibco life technologies) for 12 to 16h at 4°C, and then for 40min at 37°C. Epidermal and dermal sheets were separated and incubated in type D collagenase 2mg/ml (Roche Diagnostic, Meylan, France), 0.2 mg/ml DNase I from bovine pancreas (Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 at 37°C with shaking, for 20 min and 40 min, respectively. Next, the epidermis was incubated with 0.25X of trypsin (eurobio, Courtaboeuf, France) for 10 min, the tissue remaining was mechanically dissociated and the cellular suspension obtained filtrated (100 µm). The dermis tissue was further mechanically dissociated with gentleMACS dissociator (Miltenyi-Biotec) and the cellular suspension obtained was filtrated (100µm) remaining were.

### *Flow cytometry staining*

Cell mortality was assessed with LIVE/DEAD Fixable Dead cell stain kit (Life technology, Paisley, UK) according to supplier's instructions. Nonspecific antibodies staining were blocked by incubation with a 5% solution of pooled macaque sera. Monoclonal Abs used for immune cells characterization were: HLA-DR (clone L243)( Becton-Dickinson (BD)), CD1a (clone O10 Dako, Glostrup, Danmark), CD3 (clone SP34-2) (BD), CD45 (clone DO58-1283)(BD), CD8 (clone RPA-T8) (BD), CD20 (clone L27) (BD), CD209 (clone DCN46) (BD), CD14 (clone M5E2) (BD), CD83 (clone HB15e) (BD), CD86 (clone FUN-1) (BD), CD163 (clone GHI/61) (BD), CD11b (clone Bear 1) (Beckman Coulter), CD123 (clone 7G3) (BD), CD206 (clone 19.2) (BD), MIP1-β (D21-1351) (BD) TNFα (MAb11) (BD). CD66abce (clone TET2) (Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD1c (clone AD5-8E7) (Miltenyi-Biotec), CD207 (Baylor Institute for Immunology Research, Dallas, TX). Unlabelled Abs were detected with a secondary Ab coupled to an Alexa Fluorochrome, with the Zenon Kit (Life technology, Paisley, UK). For the detection of intracellular protein, cells were incubated in Cytofix/Cytoperm (BD) before stained with Ab diluted in Perm/Wash buffer (BD). To assess cytokines induced by our vaccination strategy, skin biopsies were put in medium with µg/ml of Brefeldin A (BFA) and kept with BFA during cell extraction process. Then surface staining and intracellular staining were performed.

Acquisition data was performed on a Fortessa cytometer (BD) and data obtained were analysed with FlowJo 9.7.1 software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

*Luminex analysis*

For cytokines analysis, medium of epidermis and dermis cell extractions were sampled and stored at -80°C. Then cytokines were measured by using the Milliplex MAP NonHuman Primates Immunoassay kit (Millipore, Billerica, MA, USA) according to supplier's instruction.

*Statistical analysis*

Percentage of skin cells were represented with mean  $\pm$  SD. Data were analyzed with Prism 5.0 (graph-pad Software Inc, La Jolla, CA, USA). The Friedman test was used to assess significant variation in cell percent over time and Wilcoxon test was used to compare variation between control and vaccinated sites.



## Results

### *Immune cells in macaque skin at steady state*

In order to identify immune cells present in macaque skin, epidermal and dermal sheets were enzymatically separated then processed to obtain homogenous cells suspension. Methods of cells extraction generate an important number of dead cells, first excluded by live/dead staining in our analysis (Fig. 1).  $CD45^+$  leukocytes in epidermis reveal the presence of two subsets. The first subset is  $CD1a^{high}CD1c^-$  and corresponds to Langerhans cells (LC) (Fig. 1A). They represent  $1.8\% \pm 1.3\%$  ( $n=11$ ) of total living epidermis cells (table 1). The second subset is  $CD1a^-CD1c^-$ , expresses CD3 and corresponds to intraepithelial T lymphocytes (Fig. 1A). These cells are relatively frequent in macaque epidermis and represent  $2.57\% \pm 3.50\%$  ( $n=11$ ) of total living cells. We noted an important variability in the proportion of epidermis T cells depending on the animals (table 1). As in human, macaque LC show a high expression of CD207 and HLA-DR, are positive for CD11c and CD11b but not for CD209 nor CD1c (BDCA1) (Peiser et al., 2008; Klechevsky et al., 2008)(Fig. 1B).

Fig. 1C shows the flow cytometry analysis and the gating strategy used to characterize immune cells in dermis. We focused our analysis on  $CD45^{high}$  cells in order to exclude auto-fluorescent cells contained in  $CD45^{low}$  gate (Fig. S1A). Granulocytes were then gated on the basis of  $HLA-DR^-CD66^+$  phenotype and were poorly represented at steady state (Fig. 1C; table1). A heterogeneous population of  $HLA-DR^+$  cells expressing CD1a and low level of CD163 was observed.  $CD1a^+$  cells, expressing CD11c and CD11b but not CD209 (Fig. 1D), were subdivided into two subsets according to the expression of CD1c (Fig. 1C). The main  $CD1a^+$  subset was positive for CD1c (Fig. 1C; table 1) and corresponds to dermal DC  $CD1a^+$  (DDC  $CD1a^+$ ). Importantly, this subset is heterogeneous, depending on the animal, for the level of expression of CD1a, and sometime two subsets of  $CD1a^+CD1c^+$  can be discriminated ( $CD1a^{high}CD1c^+$  and  $CD1a^+CD1c^+$ ). Astonishingly, these cells show an intermediate level of CD207 (Fig. 1D). The minor subset is negative for CD1c, expresses highest level of CD1a and shows an intermediate level of CD207 expression (Fig. 1C and D, table 1). This  $CD1a^+CD1c^-CD207^{int}$  phenotype, close to epidermal LC phenotype, suggested that these cells were LC in migration through dermis (mLC).  $CD1a^-$  cells included at least two subpopulations:  $CD1a^-CD14^-$  population included  $CD3^+$  T cells representing  $3.28\% \pm 2.18\%$  ( $n=13$ ) (Fig. 1C; table1);  $CD1a^-CD14^+$  cells also expressed HLA-DR. At baseline, most of these cells were  $CD163^{high}CD11b^+$  (Fig. 1C), expressed a low level of CD11c and not CD209

nor CD1c (Fig. 1D). They correspond to dermis resident macrophages and represent  $2.44\% \pm 1.75\%$  ( $n=13$ ) of total living dermis cells (table1). Among CD45<sup>+</sup> cells, an important part of cells express the APC marker HLA-DR and a subpopulation appears to be positive for CD14 and express the myeloid DC maker CD11c but at low level. The back gating analysis of this HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> subpopulation shows that these cells express a low level of CD45 (Fig. S1B). We suppose that they correspond to CD14<sup>+</sup> DC described in human. CD14<sup>+</sup> DDC in human are the less mature DC population of the skin. Consistent with these results, simian CD14<sup>+</sup>DDC express the lowest HLA-DR level compare to other DDC (Fig. S1B).

### ***Cellular events after vaccination***

#### ***Rapid recruitment of inflammatory cells in epidermis and dermis after i.d injection associated with electroporation***

To assess cells recruitment after vaccination, skin biopsies were collected at untreated sites (baseline), at day-1 (d1), -3 (d3) and -8 (d8) after PBS injection associated with EP (PBS+EP) and at site of DNA injection submitted to EP (DNA+EP). Cells were isolated from skin biopsies for flow cytometry analysis.

A significant recruitment of CD66<sup>+</sup> granulocytes was observed 1 day after injection + EP in epidermis (Fig. 2A) and dermis (Fig. 2B) at both PBS+EP and DNA+EP sites. At the same time, a significant recruitment of CD163<sup>+</sup> macrophages in epidermis was also seen at both sites (Fig. 2A) whereas no change in the proportion of CD163<sup>+</sup> cells in dermis occurred (Fig. 2B). Neither considerable change in T cells population was found over time in epidermis or in dermis after injection + EP (Fig. 2A, Fig. 2B). Surprisingly, no significant differences in cell recruitment between PBS and DNA injected sites were observed for macrophages and granulocytes in epidermis at d1 (Fig. 2A). However, it appeared that the presence of DNA enhanced granulocytes recruitment in dermis (Fig. 2B).

These data demonstrate that this vaccination strategy induced a local inflammation, especially at d1 after injection + EP. The few differences observed between PBS+EP and DNA+EP sites suggest that i.d. injection and EP had a major impact on the inflammation process. Nonetheless, the presence of DNA vaccine slightly enhanced this process.

*EP highlights three subsets in the dermal CD45<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> subpopulation*

A more precise analysis of CD45<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> population in dermis reveals that, after injection + EP, three subsets were discriminated according to the expression of CD163 and CD11b (Fig. 3A). The first subset expresses a high level of CD163 and is CD11b<sup>+</sup>. This subset is the only population represented at baseline and corresponds to resident macrophages (Fig. 1C), which seems to remain constant over time after skin treatment (Fig. 3B, subset 1). The second subset appears significantly at d1 at both injected sites + EP, without differences between sites, and expresses high level of CD11b but a modest level of CD163 (Fig. 3A, 3B, subset 2). Because these newly recruited macrophages arrived in an inflammation context, we considered them as inflammatory macrophages. The third population is CD11b<sup>+</sup> CD163<sup>-</sup>, a phenotype close to blood monocytes (Fig. S2). According to this phenotype and their localization in a tissue, suggesting their differentiation into macrophages or DC (Imhof and Aurrand-Lions, 2004), we named this population monocytoïd cells. These cells were observed at d1 in the PBS site but were recruited with significance in the presence of DNA. Nevertheless no significant difference was observed for their recruitment at both site at d1 (Fig. 3A, 3B, subset 3).

One day after vaccination, we have compared the phenotype of resident macrophages (subset 1), inflammatory macrophages (subset 2) and monocytoïd cells (subset 3) (Fig. 3C). Resident macrophages were CD14<sup>+</sup>CD163<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>CD86<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>, a phenotype which resembles to M2-type macrophages (Mosser and Edwards, 2008; Ambarus et al., 2012). By contrast, inflammatory macrophages were CD14<sup>+</sup>CD163<sup>mid</sup>CD11b<sup>high</sup>CD206<sup>-</sup>CD40<sup>-</sup>CD86<sup>+</sup> a phenotype close to M1-type macrophages (Vogel et al., 2013). Monocytoïd cells are CD163<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> and express the lowest level of HLA-DR and CD86 suggesting that they are the less activated population. The lower CD14 and the higher CD40 expression compare to inflammatory macrophages suggest that monocytoïd cells are different than inflammatory macrophages and may rather differentiate into inflammatory DC population.

In epidermis, the HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> population contains mainly CD11b<sup>high</sup>CD163<sup>mid</sup> cells, newly-recruited inflammatory macrophages as observed in dermis. No macrophages expressing a phenotype of dermal resident macrophages were detected while few monocytoïd cells were found after injection + EP (Fig. S3).

### *Impact of vaccination on skin DC population*

In dermis, CD14<sup>+</sup>DDC remain stable over time except for two animals which show an increase of this subset both at PBS+EP and DNA+EP at d8. CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>DDC also appears to remain almost stable over time except for two other animals which show an enhancement in CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>DDC frequency at d1 and d3, before their decrease close to baseline level by d8. No clear changes in CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> potent mLC were observed in dermis over time (Fig. S1C). These results suggest that injection of PBS or DNA and EP do not impact on DC population frequencies in dermis.

In epidermis, after injection + EP, two subsets can be defined according to CD1c and CD1a expression. The first one corresponds to CD1a<sup>high</sup>CD1c<sup>-</sup> LC (subset 1) and the second one expresses CD1c and an intermediate level of CD1a depending on the animal (CD1a<sup>int</sup>CD1c<sup>+</sup>, subset 2) (Fig. 4A). We have observed a transient increase of LC frequency between baseline and d1, (Fig. 4B) followed by a return to the baseline level by d3 at both sites. Paired experiments did not show differences of LC frequencies in presence of DNA (Fig. 4B, subset 1). At d1, we noted a strong up-regulation of CD86 and CD83 on a proportion of LC (Fig. 4C) and a global increase of HLA-DR expression at both PBS- and DNA-injected sites compare to baseline (Fig. 4D). These results show LC activation and maturation. The increase of LC number and their activation followed by their decrease suggested that activated matured LC leave epidermis to migrate to skin draining lymph nodes (LN) (Villablanca and Mora, 2008). Once again, EP appeared to play a preponderant role in this process, independently of the presence of DNA.

The second subset was significantly recruited at both sites at d3 after injection + EP (Fig. 4B) and corresponds to inflammatory DC, already described in inflamed human skin and named inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). No surface staining of CD207 on this subset was observed, demonstrating that these cells are distinct from LC. Yet, intracellular staining showed CD207 expression around 20% of these CD1a<sup>int</sup>CD1c<sup>+</sup> cells, suggesting they acquired LC characteristics (Fig. 4E).

## Microenvironment

### *Skin cytokines/chemokines micro-environment after injection + EP*

In order to study the microenvironment generated by the injection associated with EP, we analyzed the cytokines and chemokines released by skin sheets during the cells extraction process. Data were represented in fold increase compare to the baseline level (Fig. 5). We observed a global up-regulation of pro-inflammatory factors after injection + EP especially in presence of DNA, as IL-8, MCP-1, IL-15 in dermis and in epidermis (Fig. 5A, 5B), whereas TNF- $\alpha$ , and IL-18 are up-regulated mainly in dermis especially at d1 and d3 (Fig. 5A). The nature of increased factors was consistent with the recruitment of inflammatory cells shown previously. Anti-inflammatory factors as IL-1RA, IL-10 and sCD40L were also up-regulated as soon as d1 and were maintained up to d8 especially in dermis and in presence of DNA (Fig. 5A), which is also consistent with the rapid control of inflammation demonstrated previously. These data highlight the predominant role of DNA in the up-regulation of soluble factors after injection + EP.

### *Macrophages and monocytoïd cells produce MIP-1 $\beta$ but not TNF- $\alpha$*

DNA+EP injection sites were removed one day after injection and cells extraction were performed with addition of BFA in medium to block molecules secretion. An intracellular staining for TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  (CCL4) were performed. Resident macrophages in dermis did not produce TNF- $\alpha$  and a low number of cells produced MIP-1 $\beta$  at untreated site (Fig. 6A). At DNA+EP site, resident macrophages (CD163<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>), inflammatory macrophages (CD163<sup>mid</sup>CD11b<sup>high</sup>) and monocytoïd cells (CD163<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>), produced MIP-1 $\beta$ . The number of resident macrophages producing MIP-1 $\beta$  one day after injection was tenfold higher than at untreated site. Moreover, we observed that the frequency of cells producing MIP-1 $\beta$  was higher in resident macrophages than in inflammatory macrophages and monocytoïd cells which was the subset containing the fewest MIP-1 $\beta$ -producing cells (Fig. 6B). Surprisingly, none of these subsets produced TNF- $\alpha$ , although macrophages and especially inflammatory macrophages have been described as large TNF- $\alpha$  producer cells (Gordon, 2003). In epidermis, inflammatory macrophages were also able to produce MIP-1 $\beta$  but not TNF- $\alpha$  (Fig. 6C). The table S1 shows that only CD14<sup>+</sup> subsets in epidermis and dermis are able to produce MIP-1 $\beta$ . Other populations as T cells, CD1a<sup>+</sup> DC or CD45<sup>-</sup> cells in epidermis and dermis did

not produce TNF- $\alpha$  or MIP-1 $\beta$  at baseline or one day after vaccination. We confirm that epidermal and dermal macrophages are able to synthesized TNF- $\alpha$  after an additional *in vitro* stimulation with R848 (Fig. S4). These results suggest that our vaccination strategy induces production of the chemokine MIP-1 $\beta$  by macrophages and monocytoïd cells but not a detectable production of TNF- $\alpha$ .

## Discussion

Many studies have described adaptive immune responses obtained after vaccination but few examined the impact of innate immunity on vaccine efficiency (Pulendran and Ahmed, 2011). Strikingly, innate immunity has been shown to play a key role in the orientation of adaptive immune response (Duffy et al., 2012; Kasturi et al., 2011; Querec et al., 2006). Therefore, the link between early cellular and molecular events at vaccinated site and the type of adaptive immune response appears essential to comprehend for a better understanding of vaccination mechanisms.

Macaque is a relevant model for human immunology study because of its phylogenetic proximity with human (Yan et al., 2011; Herodin et al., 2005). This non-human primate shares an important number of human markers (Herodin et al., 2005) and is one of the best models to study anti-HIV vaccine strategies (Hatzioannou and Evans, 2012). We have previously described the strong and persistent cellular immune response obtained in intradermally vaccinated macaques with auxo-GTU multiHIV DNA vaccine (Martinon et al., 2009). In addition, the intensity and quality of this response was dramatically increased by local EP and we demonstrated that EP impacted on Ag expression in the skin. Here, we focused our study on the understanding of innate mechanisms leading to this strong adaptive immune response. However, if immune cells are well described in human skin (Angel et al., 2007; Banchereau et al., 2012; Chu et al., 2012; Haniffa et al., 2012; Klechevsky et al., 2008; Nestle et al., 1993), few studies, at our knowledge, scrutinized cell populations in macaque skin (Romain et al., 2012). In this work, we have characterized immune cells present in cynomolgus macaque skin at steady state and study early cellular and molecular events after DNA vaccination in association with EP.

Macaque epidermis contains two populations of immune cells at baseline, T cells and LC. LC show a phenotype close to humans with high level expression of CD1a, HLA-DR, CD207, and are CD11c<sup>+</sup>. However, unlike human LC, macaque LC do not express CD1c (Peiser et al., 2008; Klechevsky et al., 2008). In dermis at steady state, we have identified T cells, macrophages and two populations of CD1a<sup>+</sup> DC. None of these populations showed an expression for CD209, but this marker is sensitive to collagenase treatment (Ochoa et al., 2008) suggesting that our result can be biased. The CD14<sup>+</sup> DDC described in human (Haniffa et al., 2009; Klechevsky et al., 2008; Nestle et al., 1993) was not observed with our gating strategy, although we could identified CD45<sup>low</sup>CD14<sup>+</sup>HLADR<sup>low</sup> cells (Fig. S1) which might

correspond to this population. Nevertheless, we excluded CD45<sup>low</sup> cells from our analysis since they contain mostly autofluorescent cells. Macaque CD1a<sup>+</sup> DC contain at least two subsets: CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> and CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>. The first one probably corresponds to migratory LC described in mouse (Henri et al., 2010) and human (Pearnton et al., 2010) dermis, even if we cannot exclude a possible contamination by epidermis cells during sheets separation. The second one is probably the equivalent of human CD1a<sup>+</sup>DDC (Haniffa et al., 2012; Klechevsky et al., 2008). Unlike to human, CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> DDC show an intermediate surface expression of CD207. It seems that macaque DDC have an intermediate phenotype between human and mice, where at least two subsets of CD207<sup>+</sup> DDC have been described (Henri et al., 2010; Nagao et al., 2009; Bursch et al., 2007).

After vaccination, we have highlighted the presence of three subsets of macrophage-related cells (CD1a<sup>-</sup>HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) in dermis. The first subset (CD163<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>) corresponds to resident macrophages, present in untreated dermis, and its number is quite stable after injection associated with EP. The second one (CD163<sup>mid</sup>CD11b<sup>high</sup>) is significantly recruited one day after EP. The last one (CD163<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) was named monocytoïd cells according to their phenotype, close to blood monocytes, and their presence in cutaneous tissue. Interestingly, recent studies described the presence of resident monocytes at steady state and their enhancement in inflammation context (Tamoutounour et al., 2013; Jakubzick et al., 2013). To date, it is unknown whether the CD163<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> subset corresponds to cells in differentiation or to monocytes infiltrating the dermis. It is unlikely that this monocytoïd subset would be a contamination from blood cells since none of these cells are present in dermis at steady state. Nonetheless, blood vascularization increases in response to inflammation and might favors blood contamination.

The literature describes two major subsets of macrophages according to their function and their phenotype. In human, M1 macrophages mainly express pro-inflammatory cytokines as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 whereas M2 macrophages exhibit anti-inflammatory or wound tissue repair ability (Gordon and Taylor, 2005; Mosser and Edwards, 2008; Gordon, 2003). The expression by resident macrophages of CD163 and CD206 is associated with the M2-type (Vogel et al., 2013; Ambarus et al., 2012) and tissue macrophages phenotype (Zaba et al., 2007; Ochoa et al., 2008). The moderate level of CD163 expression and the lack of CD206 expression by recruited macrophages are closer to the M1-type (Zeyda et al., 2007; Ambarus et al., 2012; Vogel et al., 2013). One day after vaccination, resident macrophages express higher level of CD86 and CD40 than recruited macrophages. If CD86 can be expressed by



M1 and certain M2 subsets, CD40 for its part is associated with M1-type macrophages. (Gordon and Taylor, 2005; Zeyda et al., 2007; Vogel et al., 2013). However, high expression of CD11b has been associated with M2 and not with M1-type (Zeyda et al., 2007; Ambarus et al., 2012). These results highlight macrophage orientation plasticity, as already shown (Porcheray et al., 2005; Zeyda et al., 2007; Vogel et al., 2013; Fuentes-Duculan et al., 2010), where M2 resident macrophages expressed markers associated with M1 and produced pro-inflammatory molecules in an inflammation context. Accordingly, we showed that after DNA+EP injection, resident macrophages produce higher amount of inflammatory chemokine MIP-1 $\beta$  (CCL4) than recruited macrophages or monocytoïd cells. Surprisingly, no HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> subsets display a production of TNF- $\alpha$  neither at steady state nor after injection, although this cytokine is known to be secreted in high amount by macrophages, especially by M1 (Ambarus et al., 2012; Zeyda et al., 2007; Fuentes-Duculan et al., 2010). The ability of skin macrophages from DNA+EP site to produce TNF- $\alpha$  was confirmed after *in vitro* stimulation with R848, suggesting that DNA+EP do not stimulate macrophages to synthesized TNF- $\alpha$ . Nevertheless, we cannot exclude that TNF- $\alpha$  production occurred earlier or was below the threshold of sensitivity of our experimental procedure.

Previously, we demonstrated that DNA immunization with or without EP influences local vaccinal Ag production (Martinon et al., 2009). Without EP, Ag was exclusively produced in dermis, while with EP, it was produced in dermis and in large amount in epidermis, especially in differentiated keratinocytes of superior layer. Indeed, after immunization without EP, LC are close to the basement membrane whereas with EP they migrate to the superior layer of epidermis and uptake the antigen (Martinon et al., 2009). In the present work, we observed a first increase of LC and their activation, illustrated by an up-regulation of HLA-DR, CD86 and CD83, one day after vaccination at EP site. We can hypothesize that EP facilitates Ag uptake produced by keratinocytes through the recruitment and activation of LC. The decrease of LC observed between d1 and d3 suggested that activated LC, probably charged with Ag, leave epidermis to migrate to skin draining LN in order to present Ag to T cells (Moll et al., 1993).

Additionally, after vaccination, a population of CD1a<sup>+</sup> cells, distinct from LC, appears in epidermis significantly three days after EP. Its cell surface phenotype is CD1a<sup>int</sup>CD1c<sup>+</sup>CD207<sup>-</sup> and corresponds to IDEC already described in human epidermis in a context of inflammation (Wollenberg and Mommaas, 2002; Dijkstra et al., 2008). IDEC have also been identified in dermis (Chu et al., 2011; Guttman-Yassky et al., 2007). However, a proportion of these cells

express CD207 in the intracellular compartment, indicating that they could be related to LC. In addition, their recruitment in an inflammatory context suggests that they might even be LC precursor derived from blood monocytes, as described in several mouse studies (Seré et al., 2012; Merad et al., 2002). Besides, these CD1a<sup>int</sup> CD1c<sup>+</sup> cells enhance CD1a and decrease CD1c expression, during the 8 days post-vaccination, to a phenotype similar to LC.

DNA seems to have a poor role in cells recruitment and mobilization since no significant differences were observed between PBS+EP and DNA+EP sites for macrophages, granulocytes (in epidermis) and IDEC recruitment, LC mobilization and their activation. Only a significant enhancement of granulocytes in dermis at DNA+EP compare to PBS+EP sites was observed one day after injection. These results strongly imply a main role of EP in the inflammation process and cells activation, in accordance with previous works showing the importance of EP on cellular immune response intensity enhancement obtained after DNA vaccination (Hirao et al., 2010; Rosati et al., 2008; Martinon et al., 2009). Some studies suggested that this enhancement was due to a stronger level of Ag synthesis after EP by local cells as well as a potent adjuvant effect from EP (Ulmer et al., 2006; Roos et al., 2009). We propose that EP strengthens the immune response intensity not only by enhancing level of vaccine Ag synthesis (Martinon et al., 2009; Roos et al., 2009) but also through a strong adjuvant effect which activates local cutaneous DC as LC and induces recruitment of inflammatory immune cells as granulocytes, monocytes/macrophages and inflammatory DC. These phenomena can lead to facilitate antigen uptake by local or recruited DC as well as their migration to skin draining LN to activate specific T cells.

Finally, examination of the microenvironment showed enhancement of inflammatory cytokines after DNA+EP as TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-18, MIP-1 $\beta$  (CCL4) or MCP-1 (CCL2) rather at d1 and d3. These results are consistent with the peak of inflammation observed at d1 by flow cytometry analysis. MCP-1 and MIP-1 $\beta$  are known to be involved in monocytes/macrophages recruitment, and are probably responsible for the first wave of monocytes/macrophages recruitment observed at d1 after injection+EP. Indeed, we have shown that resident macrophages are the main producer of MIP-1 $\beta$  and are known to produce MCP-1 (Gordon, 2003; Stout et al., 2005). Consequently resident macrophages are probably mainly involved in recruitment of new monocytes/macrophages at injected site. Interestingly, we observed an enhancement of IL-18 in epidermis and in dermis at d3. This result is consistent with previous studies which have shown that IL-18 can be produced by IDEC (Novak et al., 2004), and

which have demonstrated that IDEC are recruited in epidermis and in large amount in dermis in inflammation context (Guttman-Yassky et al., 2007).

In parallel, we observed the development of an anti-inflammatory context with IL-1RA and sCD40L secretions, probably allowing rapid control of inflammation which returns to baseline level by d8.

We note an increase of IL-15, involved in T cells activation (Banchereau et al., 2012; Klebanoff et al., 2004; Dubsky et al., 2007), at DNA+EP site at each time point studied in both epidermis and dermis. This increase in IL-15 is consistent with the strong T cell responses induced by this vaccination strategy (Martinon et al., 2009).

The majority of these soluble factors were more up-regulated in presence of DNA arguing for a role of vaccine on this inflammation. This observation is consistent with Ross *et al.* who showed that skin injection of DNA with EP induced a significant higher gene expression than in skin that got either treatment alone (Roos et al., 2009). Altogether, these results demonstrate a synergy between EP and DNA vaccine on the level of soluble factor synthesized in the skin in response to treatment.

To conclude, our results suggest that the recruitment of inflammatory cells in the skin was mainly due to the EP, whereas the production of cytokines/chemokines was dependent on the injection of DNA.

## **Acknowledgments**

This work benefited from the technical support of the core laboratory (TIPIV) of the Division of Immuno-Virology (CEA) for the immune monitoring of animals and flow cytometry analysis (FlowCyTech). We thank C. Joubert and J.M. Helies, veterinary surgeons, for the supervision and assistance with animal care.

## References

1. Koup, R. A., and D. C. Douek. 2011. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1: a007252.
2. Gaucher, D., R. Therrien, N. Kettaf, B. R. Angermann, G. Boucher, A. Filali-Mouhim, J. M. Moser, R. S. Mehta, D. R. Drake, E. Castro, R. Akondy, A. Rinfret, B. Yassine-Diab, E. a Said, Y. Chouikh, M. J. Cameron, R. Clum, D. Kelvin, R. Somogyi, L. D. Greller, R. S. Balderas, P. Wilkinson, G. Pantaleo, J. Tartaglia, E. K. Haddad, and R.-P. Sékaly. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J. Exp. Med.* 205: 3119–31.
3. Zheng, D., Y. Yi, and Z. Chen. 2012. Development of live-attenuated influenza vaccines against outbreaks of H5N1 influenza. *Viruses* 4: 3589–605.
4. Baba, T. W., V. Liska, a H. Khimani, N. B. Ray, P. J. Dailey, D. Penninck, R. Bronson, M. F. Greene, H. M. McClure, L. N. Martin, and R. M. Ruprecht. 1999. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat. Med.* 5: 194–203.
5. Shedlock, D. J., and D. B. Weiner. 2000. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leukoc. Biol.* 68: 793–806.
6. Cardoso, a I., M. Blixenkrone-Moller, J. Fayolle, M. Liu, R. Buckland, and T. F. Wild. 1996. Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. *Virology* 225: 293–9.
7. Tang, D. C., M. DeVit, and S. A. Johnston. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152–4.
8. Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, and a Friedman. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745–9.
9. Hu, S.-L. 2005. Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 5: 193–201.
10. Gardner, M. B., and P. a Luciw. 2008. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J.* 49: 220–55.
11. Hutnick, N. a, D. J. F. Myles, C. B. Bian, K. Muthumani, and D. B. Weiner. 2011. Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo. *Curr. Opin. Virol.* 1: 233–40.
12. Liu, M. a, B. Wahren, and G. B. Karlsson Hedestam. 2006. DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum. Gene Ther.* 17: 1051–61.
13. Casimiro, D. R., L. Chen, T.-M. Fu, R. K. Evans, M. J. Caulfield, M.-E. Davies, A. Tang, M. Chen, L. Huang, V. Harris, D. C. Freed, K. A. Wilson, S. Dubey, D.-M. Zhu, D. Nawrocki, H. Mach, R. Troutman, L. Isopi, D. Williams, W. Hurni, Z. Xu, J. G. Smith, S.

- Wang, X. Liu, L. Guan, R. Long, W. Trigona, G. J. Heidecker, H. C. Perry, N. Persaud, T. J. Toner, Q. Su, X. Liang, R. Youil, M. Chastain, A. J. Bett, D. B. Volkin, E. A. Emini, and J. W. Shiver. 2003. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* 77: 6305–13.
14. Kodihalli, S., H. Goto, D. L. Kobasa, S. Krauss, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. 1999. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J. Virol.* 73: 2094–2098.
15. Ferraro, B., M. P. Morrow, N. a Hutnick, T. H. Shin, C. E. Lucke, and D. B. Weiner. 2011. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin. Infect. Dis.* 53: 296–302.
16. Hirao, L. a, L. Wu, A. Satishchandran, A. S. Khan, R. Draghia-Akli, A. C. Finnefrock, A. J. Bett, M. R. Betts, D. R. Casimiro, N. Y. Sardesai, J. J. Kim, J. W. Shiver, and D. B. Weiner. 2010. Comparative analysis of immune responses induced by vaccination with SIV antigens by recombinant Ad5 vector or plasmid DNA in rhesus macaques. *Mol. Ther.* 18: 1568–76.
17. Martinon, F., K. Kaldma, R. Sikut, S. Culina, G. Romain, M. Tuomela, M. Adojaan, A. Männik, U. Toots, T. Kivisild, J. Morin, P. Brochard, B. Delache, A. Tripiciano, F. Ensoli, I. Stanescu, R. Le Grand, and M. Ustav. 2009. Persistent immune responses induced by a human immunodeficiency virus DNA vaccine delivered in association with electroporation in the skin of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 20: 1291–307.
18. Rosati, M., A. Valentin, R. Jalah, V. Patel, A. von Gegerfelt, C. Bergamaschi, C. Alicea, D. Weiss, J. Treece, R. Pal, P. D. Markham, E. T. a Marques, J. T. August, A. Khan, R. Draghia-Akli, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 2008. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine* 26: 5223–9.
19. Krohn, K., I. Stanescu, V. Blazevic, T. Vesikari, A. Ranki, and M. Ustav. 2005. A DNA HIV-1 vaccine based on a fusion gene expressing non-structural and structural genes of consensus sequence of the A-C subtypes and the ancestor sequence of the F-H subtypes. Preclinical and clinical studies. *Microbes Infect.* 7: 1405–13.
20. Djuranovic, D., C. Oguey, and B. Hartmann. 2004. The role of DNA structure and dynamics in the recognition of bovine papillomavirus E2 protein target sequences. *J. Mol. Biol.* 339: 785–96.
21. Pulendran, B., and R. Ahmed. 2011. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12: 509–517.
22. Seneschal, J., R. a Clark, A. Gehad, C. M. Baecher-Allan, and T. S. Kupper. 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36: 873–84.
23. Duffy, D., H. Perrin, V. Abadie, N. Benhabiles, A. Boissonnas, C. Liard, B. Descours, D. Reboulleau, O. Bonduelle, B. Verrier, N. Van Rooijen, C. Combadière, and B. Combadière. 2012. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity* 37: 917–29.

24. Querec, T., S. Bennouna, S. Alkan, Y. Laouar, K. Gorden, R. Flavell, S. Akira, R. Ahmed, and B. Pulendran. 2006. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 203: 413–24.
25. Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, a K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29: 497–510.
26. Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X.-N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. K. Y. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37: 60–73.
27. Li, D., G. Romain, A.-L. Flamar, D. Duluc, M. Dullaers, X.-H. Li, S. Zurawski, N. Bosquet, A. K. Palucka, R. Le Grand, A. O’Garra, G. Zurawski, J. Banchereau, and S. Oh. 2012. Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 209: 109–21.
28. Chu, C.-C., P. Di Meglio, and F. O. Nestle. 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin. Immunol.* 23: 28–41.
29. Valladeau, J., and S. Saeland. 2005. Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17: 273–83.
30. Birbeck, M. S., A. S. Breathnach, and J. D. Overall. 1961. An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo1. *J. Invest. Dermatol.* 37: 51–64.
31. Lenz, A., M. Heine, G. Schuler, and N. Romani. 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J. Clin. Invest.* 92: 2587–96.
32. Nestle, F. O., X. G. Zheng, C. B. Thompson, L. a Turka, and B. J. Nickoloff. 1993. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* 151: 6535–45.
33. Henri, S., L. F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2010. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207: 189–206.
34. Bursch, L. S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. H. Kaplan, and K. a Hogquist. 2007. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204: 3147–56.

35. Takahara, K., Y. Omatsu, Y. Yashima, Y. Maeda, S. Tanaka, T. Iyoda, B. Clusen, K. Matsubara, J. Letterio, R. M. Steinman, Y. Matsuda, and K. Inaba. 2002. Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. *Int. Immunol.* 14: 433–444.
36. Zaba, L. C., J. Fuentes-Duculan, R. M. Steinman, J. G. Krueger, and M. A. Lowes. 2007. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J. Clin. Invest.* 117: 2517–25.
37. Ochoa, M. T., A. Loncaric, S. R. Krutzik, T. C. Becker, and R. L. Modlin. 2008. “Dermal dendritic cells” comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J. Invest. Dermatol.* 128: 2225–31.
38. Haniffa, M., F. Ginhoux, X.-N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilkens, M. Merad, and M. Collin. 2009. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* 206: 371–85.
39. Bond, E., W. C. Adams, A. Smed-Sörensen, K. J. Sandgren, L. Perbeck, A. Hofmann, J. Andersson, and K. Loré. 2009. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *J. Immunol. Methods* 348: 42–56.
40. Stoitzner, P., N. Romani, A. D. McLellan, C. H. Tripp, and S. Ebner. 2010. Isolation of skin dendritic cells from mouse and man. *Methods Mol. Biol.* 595: 235–48.
41. Peiser, M., J. Koeck, C. J. Kirschning, B. Wittig, and R. Wanner. 2008. Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4+T cell stimulatory capacity. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1118–27.
42. Imhof, B. a, and M. Aurrand-Lions. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 432–44.
43. Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958–69.
44. Ambarus, C. a, S. Krausz, M. van Eijk, J. Hamann, T. R. D. J. Radstake, K. a Reedquist, P. P. Tak, and D. L. P. Baeten. 2012. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* 375: 196–206.
45. Vogel, D. Y. S., E. J. F. Vereyken, J. E. Glim, P. D. a M. Heijnen, M. Moeton, P. van der Valk, S. Amor, C. E. Teunissen, J. van Horssen, and C. D. Dijkstra. 2013. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J. Neuroinflammation* 10: 35.
46. Villablanca, E. J., and J. R. Mora. 2008. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur. J. Immunol.* 38: 2975–80.
47. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23–35.
48. Kasturi, S. P., I. Skountzou, R. A. Albrecht, D. Koutsonanos, T. Hua, H. I. Nakaya, R. Ravindran, S. Stewart, M. Alam, M. Kwissa, F. Villinger, N. Murthy, J. Steel, J. Jacob, R. J.

Hogan, A. García-Sastre, R. Compans, and B. Pulendran. 2011. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470: 543–7.

49. Yan, G., G. Zhang, X. Fang, Y. Zhang, C. Li, F. Ling, D. N. Cooper, Q. Li, Y. Li, A. J. van Gool, H. Du, J. Chen, R. Chen, P. Zhang, Z. Huang, J. R. Thompson, Y. Meng, Y. Bai, J. Wang, M. Zhuo, T. Wang, Y. Huang, L. Wei, J. Li, Z. Wang, H. Hu, P. Yang, L. Le, P. D. Stenson, B. Li, X. Liu, E. V Ball, N. An, Q. Huang, Y. Zhang, W. Fan, X. Zhang, Y. Li, W. Wang, M. G. Katze, B. Su, R. Nielsen, H. Yang, J. Wang, X. Wang, and J. Wang. 2011. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques. *Nat. Biotechnol.* 29: 1019–23.

50. Herodin, F., P. Thullier, D. Garin, and M. Drouet. 2005. Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. *Eur. Cytokine Netw.* 16: 104–116.

51. Hatziioannou, T., and D. T. Evans. 2012. Animal models for HIV/AIDS research. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 852–67.

52. Angel, C. E., A. Lala, C.-J. J. Chen, S. G. Edgar, L. L. Ostrovsky, and P. R. Dunbar. 2007. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int. Immunol.* 19: 1271–9.

53. Banchereau, J., L. Thompson-Snipes, S. Zurawski, J.-P. Blanck, Y. Cao, S. Clayton, J.-P. Gorvel, G. Zurawski, and E. Klechevsky. 2012. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood* 119: 5742–9.

54. Chu, C.-C., N. Ali, P. Karagiannis, P. Di Meglio, A. Skowera, L. Napolitano, G. Barinaga, K. Gryns, E. Sharif-Paghaleh, S. N. Karagiannis, M. Peakman, G. Lombardi, and F. O. Nestle. 2012. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* 209: 935–45.

55. Romain, G., E. Van Gulck, O. Epaulard, S. Oh, D. Li, G. Zurawski, S. Zurawski, A. Cosma, L. Adam, C. Chapon, B. Todorova, J. Banchereau, N. Dereuddre-Bosquet, G. Vanham, R. Le Grand, and F. Martinon. 2012. CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur. J. Immunol.* 42: 2019–2033.

56. Pearnton, M., S.-M. Kang, J.-M. Song, A. V Anstey, M. Ivory, R. W. Compans, and J. C. Birchall. 2010. Changes in human Langerhans cells following intradermal injection of influenza virus-like particle vaccines. *PLoS One* 5: e12410.

57. Nagao, K., F. Ginhoux, W. W. Leitner, S.-I. Motegi, C. L. Bennett, B. E. Clausen, M. Merad, C. Udey, and Mark. 2009. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *PNAS* 106: 3312–3317.

58. Tamoutounour, S., M. Guillems, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri. 2013. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* 39: 925–938.



59. Jakubzick, C., E. L. Gautier, S. L. Gibbings, D. K. Sojka, A. Schlitzer, T. E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J. R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D. W. H. Riches, W. M. Yokoyama, F. Ginhoux, P. M. Henson, and G. J. Randolph. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39: 599–610.
60. Gordon, S., and P. R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 953–64.
61. Zeyda, M., D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Gy  ri, G. J. Zlabinger, and T. M. Stulnig. 2007. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes. (Lond)*. 31: 1420–8.
62. Porcheray, F., S. Viaud, a-C. Rimaniol, C. L  one, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, and G. Gras. 2005. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 142: 481–9.
63. Fuentes-Duculan, J., M. Suárez-Fariñas, L. C. Zaba, K. E. Nograles, K. C. Pierson, H. Mitsui, C. a Pensabene, J. Kzhyshkowska, J. G. Krueger, and M. a Lowes. 2010. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 130: 2412–22.
64. Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. R  llinghoff. 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 23: 1595–601.
65. Wollenberg, A., and M. Mommaas. 2002. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 118: 327–334.
66. Dijkstra, D., H. Stark, P. L. Chazot, F. C. Shenton, R. Leurs, T. Werfel, and R. Gutzmer. 2008. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H4 receptor. *J. Invest. Dermatol.* 128: 1696–703.
67. Guttman-Yassky, E., M. a Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J. a Carucci, R. Bergman, and J. G. Krueger. 2007. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 1210–7.
68. Ser  , K., J.-H. Baek, J. Ober-Bl  baum, G. M  ller-Newen, F. Tacke, Y. Yokota, M. Zenke, and T. Hieronymus. 2012. Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity* 37: 905–916.
69. Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster, and E. G. Engleman. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 3: 1135–41.
70. Ulmer, J. B., B. Wahren, and M. a Liu. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.* 12: 216–22.

71. Roos, A.-K., F. Eriksson, J. a Timmons, J. Gerhardt, U. Nyman, L. Gudmundsdotter, A. Bråve, B. Wahren, and P. Pisa. 2009. Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. *PLoS One* 4: e7226.
72. Stout, R., C. Jiang, and B. Matta. 2005. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 175: 342–349.
73. Novak, N., R. Valenta, B. Bohle, S. Laffer, J. Haberstok, S. Kraft, and T. Bieber. 2004. FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 949–57.
74. Klebanoff, C. a, S. E. Finkelstein, D. R. Surman, M. K. Lichtman, L. Gattinoni, M. R. Theoret, N. Grewal, P. J. Spiess, P. a Antony, D. C. Palmer, Y. Tagaya, S. a Rosenberg, T. a Waldmann, and N. P. Restifo. 2004. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 1969–74.
75. Dubsky, P., H. Saito, M. Leogier, C. Dantin, J. E. Connolly, J. Banchereau, and a K. Palucka. 2007. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8+ T cells to differentiate into CTL. *Eur. J. Immunol.* 37: 1678–90.

**Table**
**Table 1: frequencies of immune cells in normal dermis and epidermis.**

	CD3 <sup>+</sup>	CD66 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD163 <sup>-</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD11b <sup>high</sup> CD163 <sup>int</sup>	CD14 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup>	CD1a <sup>+</sup> CD1c <sup>+</sup>	CD1a <sup>+</sup> CD1c <sup>-</sup>
<b>Epidermis n=11</b>	2.57±3.50	0.001±0.002	0.002±0.005	0.002±0.003	0.002±0.003	0.15±0.36	1.80±1.34
<b>Dermis n=13</b>	3.28±2.18	0.12±0.21	0.21±0.18	0.1±0.09	2.44±1.75	0.29±0.34	0.18±0.14

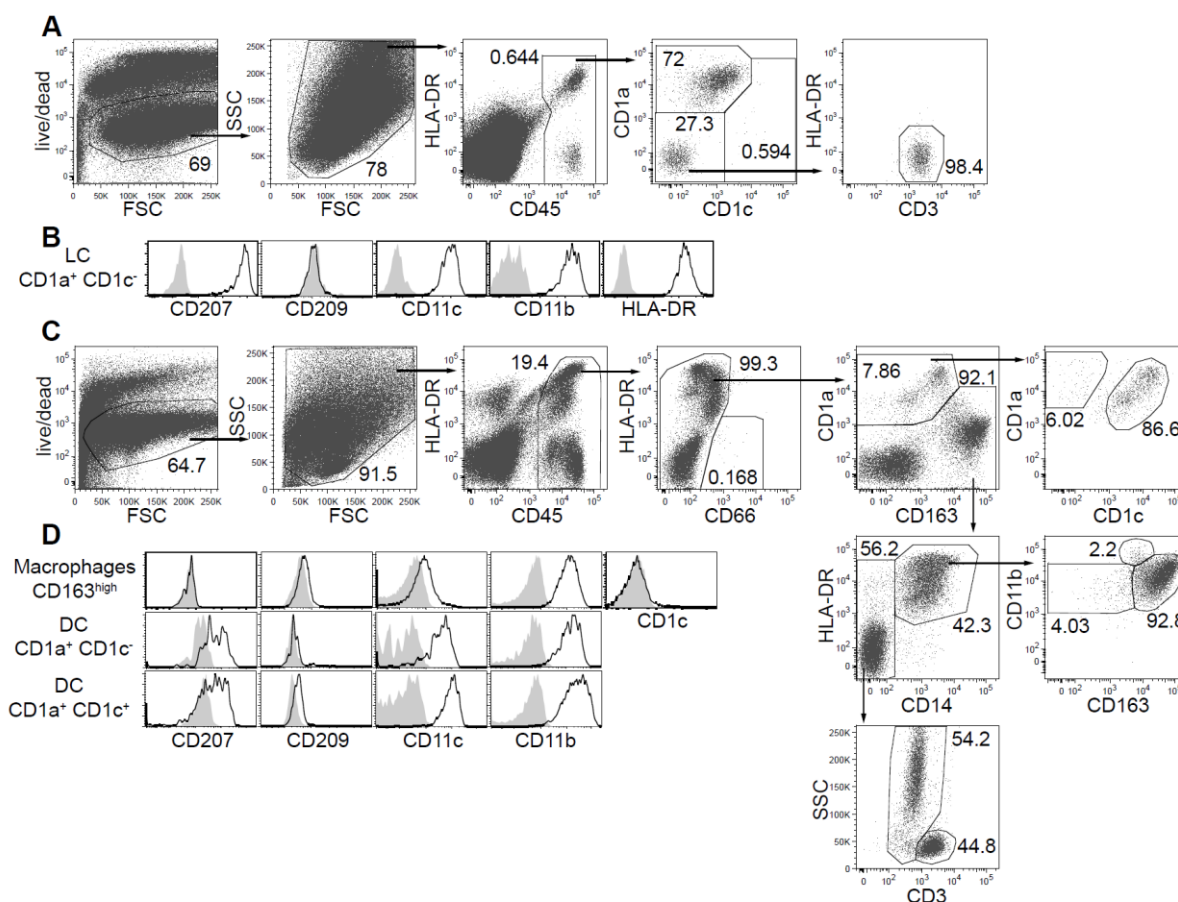
Mean percentage of each subset among living cells ± SD

**Table S1: frequency of MIP-1β and TNF-α-producing cells after vaccination.**

		CD45 <sup>-</sup>		CD1a <sup>+</sup>		CD14 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup>	
		baseline	DNA+EP	baseline	DNA+EP	baseline	DNA+EP	baseline	DNA+EP
<b>epidermis</b>	TNF-α	0.0215	0.0525	0.123	0	x	2.28	0.62	0.327
	MIP-1β	0.00338	0.0141	0.123	0.377	x	13.9	0	0.982
<b>dermis</b>	TNF-α	0.679	0.286	0	0	0.533	0.282	0.22	0
	MIP-1β	0.198	0.721	0	0.914	2.84	10.1	0.22	0.549

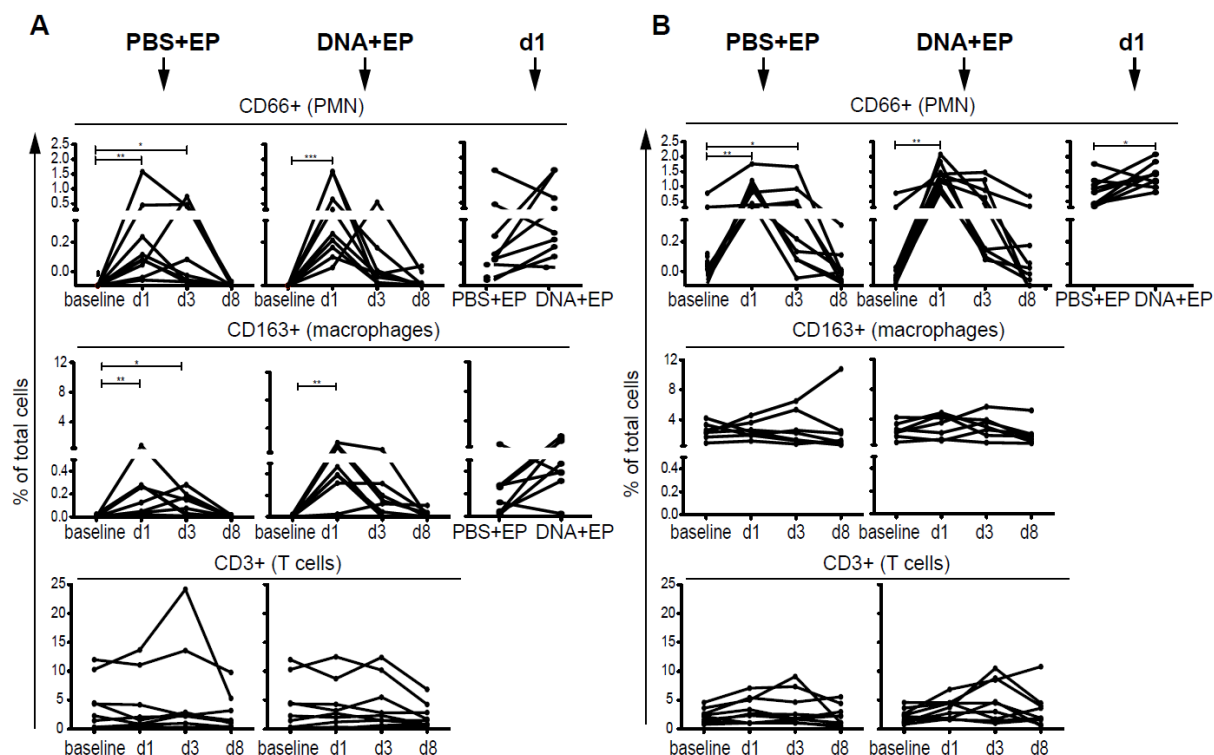
Frequencies of MIP-1β and TNF-α-producing cells at baseline or one day after DNA+EP vaccination in epidermis and dermis among CD45<sup>-</sup> cells, CD1a<sup>+</sup> DC CD14<sup>+</sup> macrophages and CD3<sup>+</sup> T cells, presented for one animal (n=2).

# Figures and legends



**Figure 1: immune cells in normal skin.**

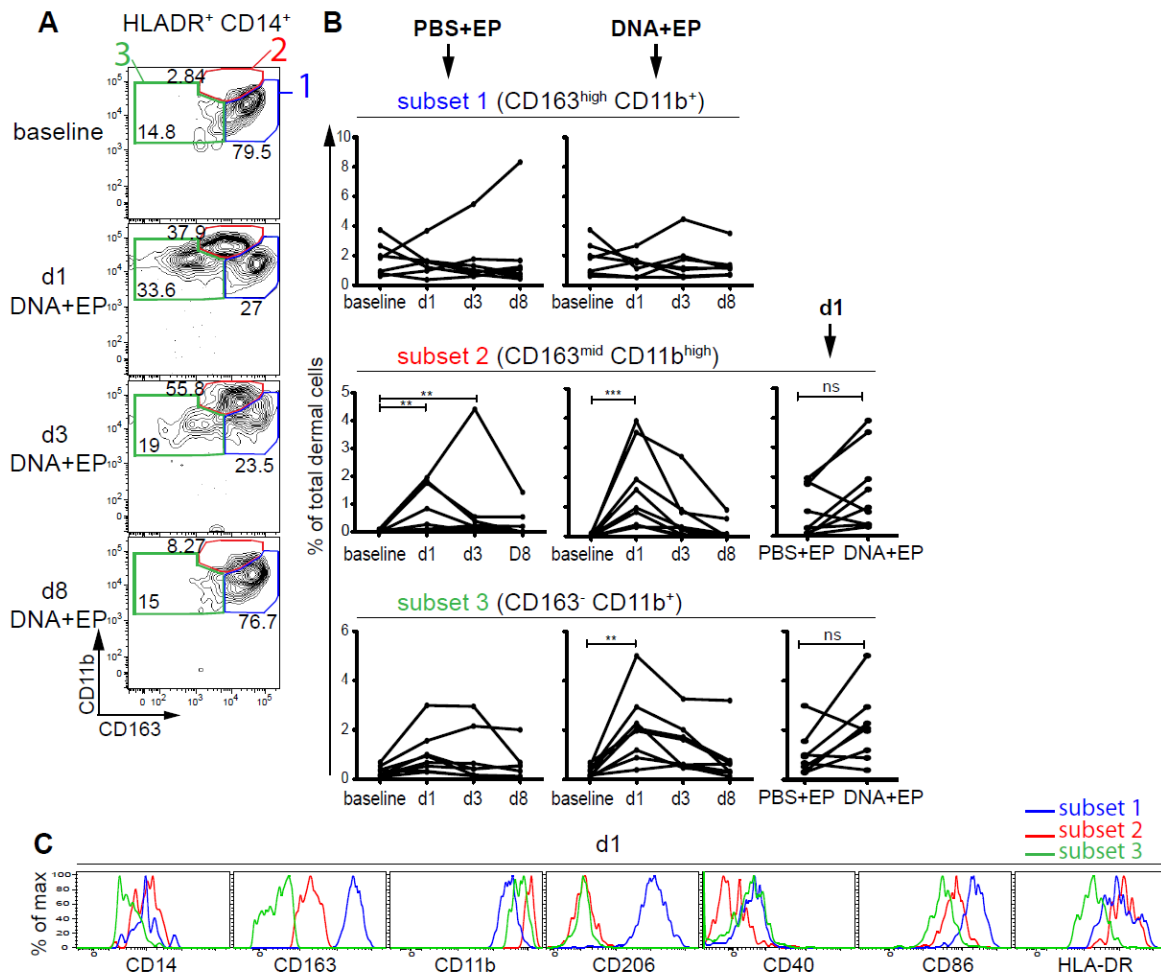
Flow cytometry analysis of normal immune cells of epidermis (A and B) and dermis (C and D). Representation of the gating strategy used to analyze epidermal immune cells (A). CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> LC surface staining (black line), and isotype control on CD1a<sup>+</sup> epidermis cells (grey filled area) (B). Representation of the gating strategy used to analyze dermal immune cells (C). Surface staining on CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> DC, CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> DC and CD163<sup>+</sup> macrophages (black line) and isotype control (grey filled area) (D).



**Figure 2: immune cells recruited in epidermis after injection+ EP.**

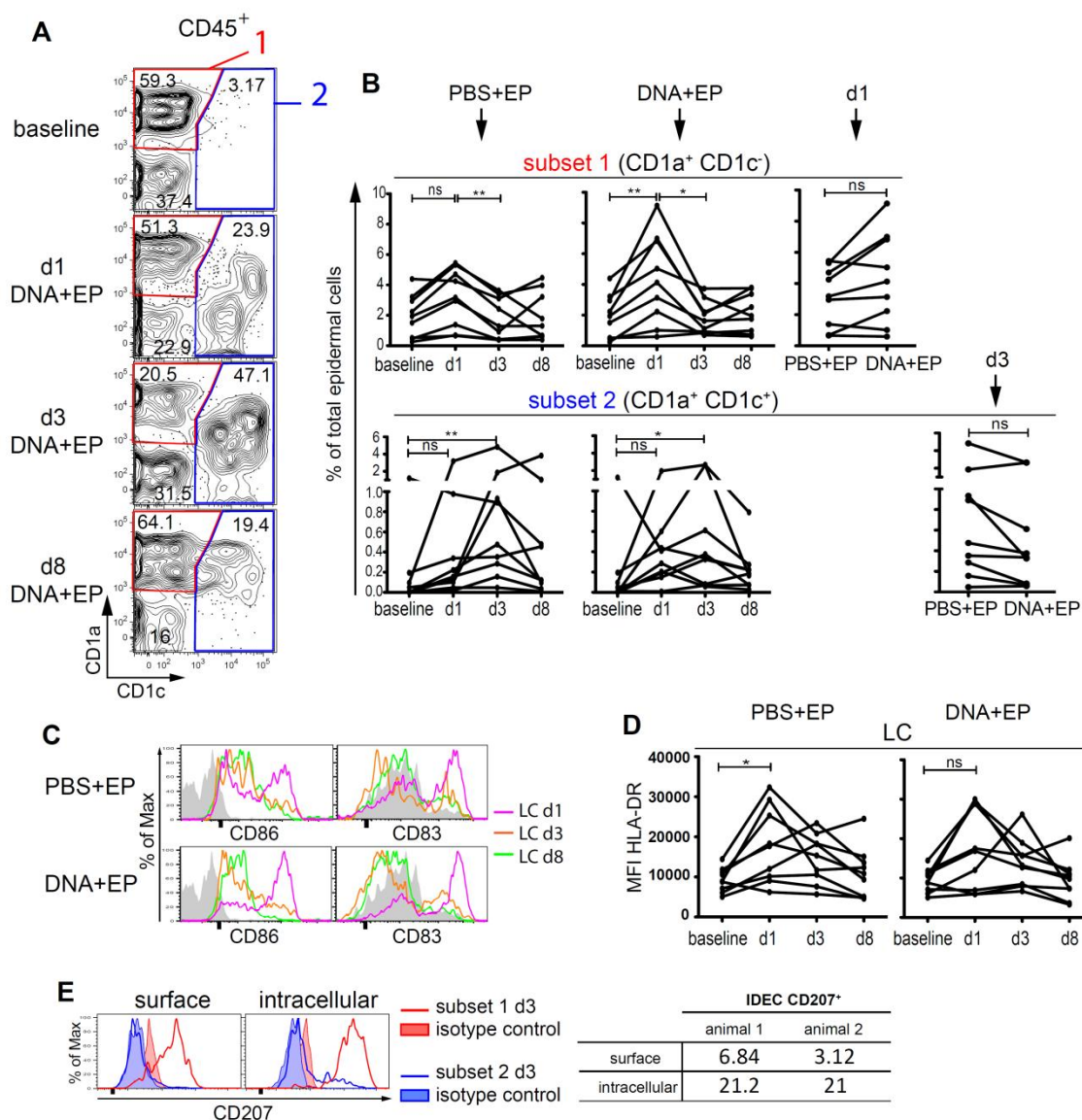
Percentage of immune cells over time in total living cells in epidermis (A) and dermis (B) at PBS+EP-control site or DNA+EP-vaccinated site. In the case of significant difference observed at control and vaccinated site, comparison between both sites were performed at the corresponding date (A and B). Each line represents one animal.

Friedman test was used to compare immune cells recruitment over time and Wilcoxon t test was used to compare cells mobilization between PBS+EP and DNA+EP sites at 24h (d1) (A and B); \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



**Figure 3: three HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> subsets appear after injection + EP in dermis.**

Flow cytometry analysis of CD11b and CD163 surface expression on dermal CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> cells at untreated site (baseline) and 24h (d1), 72h (d3) or 8 days (d8) after DNA + EP vaccination (A). Frequencies of CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD163<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> cells (subset 1), CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD163<sup>mid</sup> CD11b<sup>high</sup> cells (subset 2) and CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> cells (subset 3) measured over time at PBS+EP and DNA+EP sites. In the case of significant difference observed at PBS+EP or DNA+EP sites, comparisons between both sites were performed at the corresponding date (A and B). Each line represents one animal. Friedman test was used to compare immune cells recruitment over time and Wilcoxon t test to compare cells mobilization between PBS+EP and DNA+EP sites 24h after injection (d1) (B); \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001. The three subsets isolated at d1 after DNA+EP vaccination were analyzed for surface expression of different markers (C).

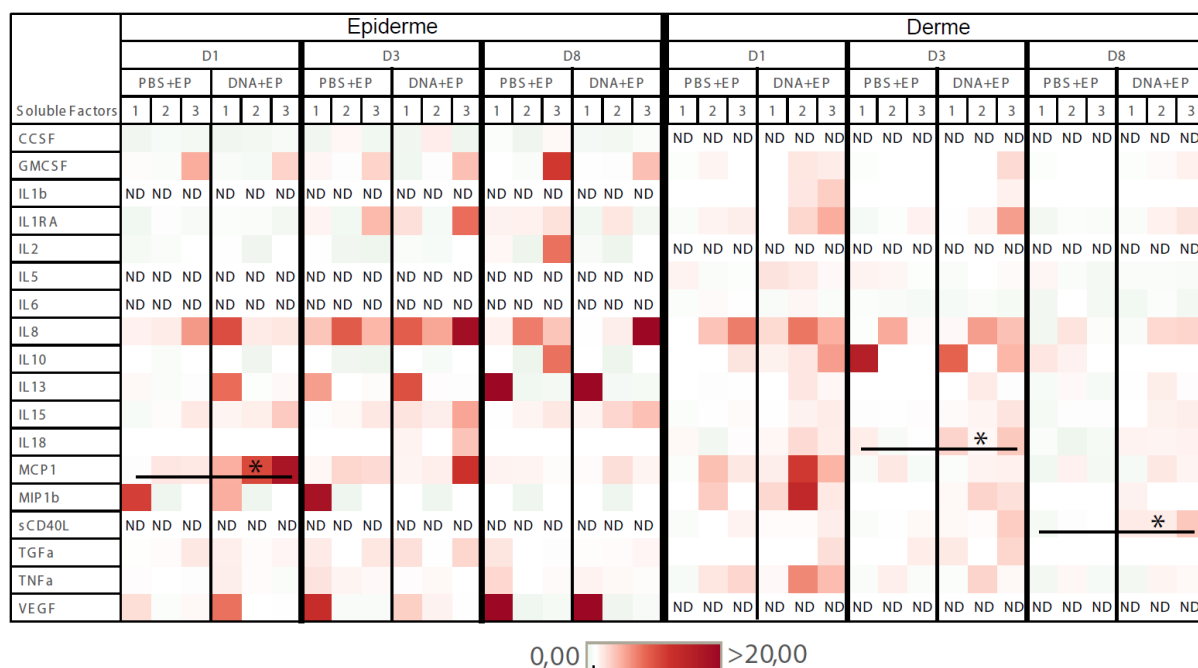


**Figure 4: LC cells mobilization and their activation state after injection + EP.**

Flow cytometry analysis of CD1a and CD1c surface markers expression on epidermal CD45<sup>+</sup> cells at untreated site (baseline) and 24h (d1), 72h (d3) or 8 days (d8) after DNA + EP vaccination (A). Frequencies of CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> cells (subset 1) and CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> cells (subset 2) measured over time at PBS+EP site and at DNA+EP site. In the case of significant difference observed at PBS+EP or DNA+EP sites, comparisons between both sites were performed at the corresponding date (B). Each line represents one animal. CD1a<sup>+</sup> cells expression of CD86 and CD83 at d1 (pink), d3 (orange) and d8 (green) compare to baseline (grey filled area) at PBS+EP and DNA+EP sites (C). CD1a<sup>+</sup> cells mean fluorescent intensity (MFI) for HLA-DR at PBS+EP and DNA+EP sites (D). Surface and intracellular staining for CD207 performed 72h (d3) after DNA+EP vaccination on CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> (subset 1) (red) and

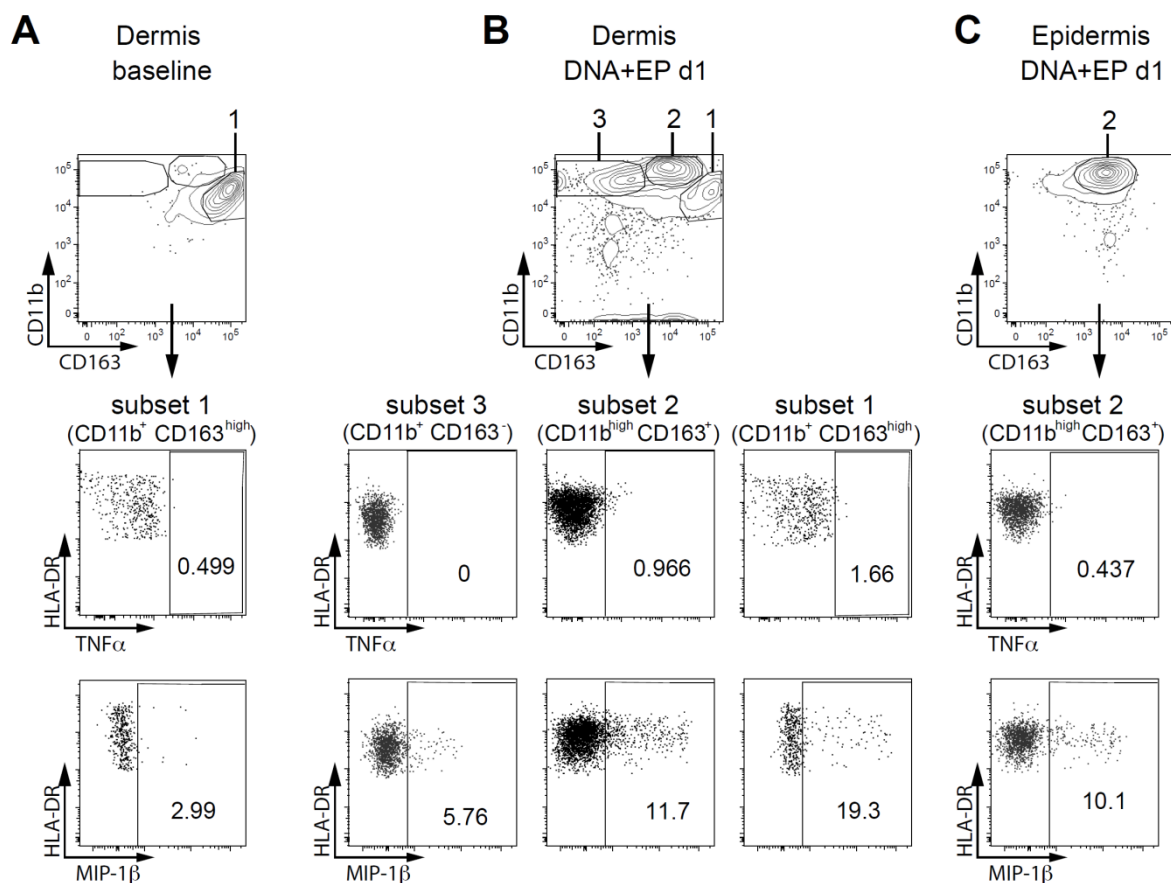
CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> cells (subset 2) (blue). Corresponding isotype controls are on the same color in filled line. The percentage of CD207<sup>+</sup> cells within CD1a<sup>+</sup>CD1<sup>+</sup> subset 2 were indicated for two animals (E). Friedman test was used to compare immune cells recruitment over time (B and D) and Wilcoxon t test to compare cells mobilization between PBS+EP and DNA+EP sites 24h (d1) or 72h (d3) after injection (B); \*, p<0.05; \*\*, p<0.01.





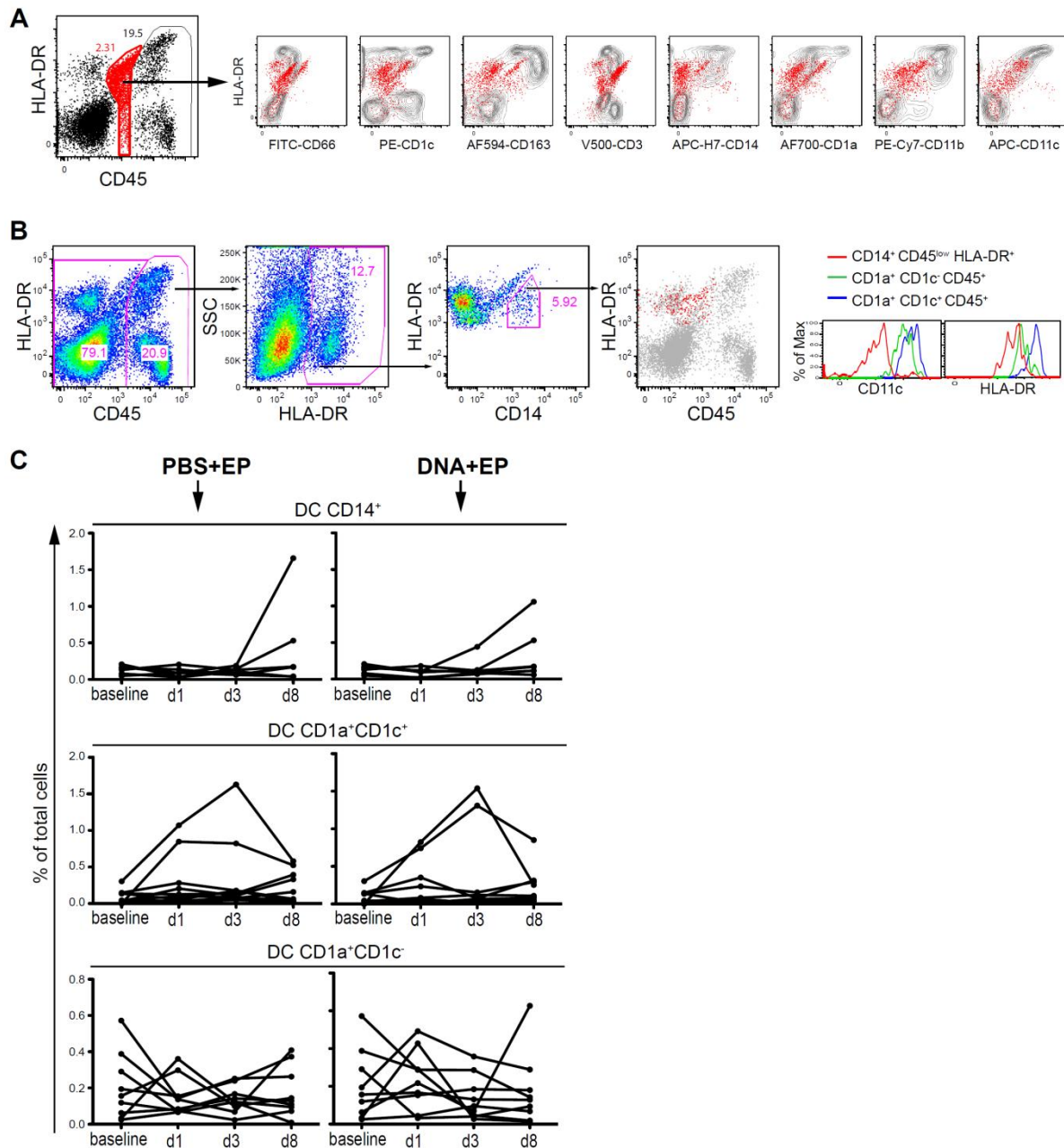
**Figure 5: cytokines production in skin after injection + EP over time.**

Heat Map representation of cytokines secreted in epidermis (A) or dermis (B) at 24h (d1) 72h (d3) or 8 days (d8) after PBS+EP or DNA+EP injections. Results were represented in fold increase for specimen 1, 2 and 3. ND: cytokines production under level of detection. Statistic analysis highlight significant difference measured for indicated date between PBS+EP and DNA+EP. Two way anova test was used with bonferroni post test; \*,  $p < 0.05$ .



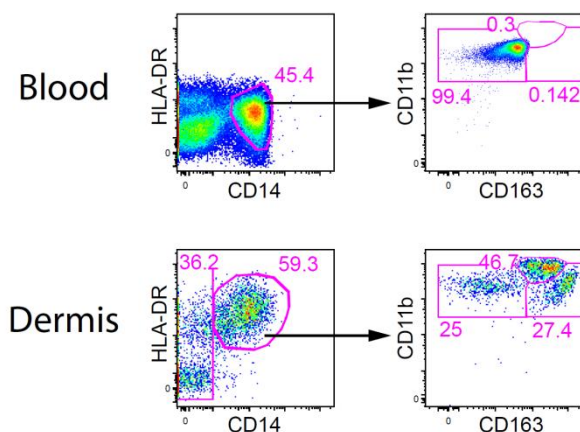
**Figure 6: CD14<sup>+</sup> subsets produce MIP-1β but no TNF-α after vaccination.**

CD45<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> population of dermis (A and B) or epidermis (C) were stained for intracellular TNF-α and MIP-1β. In untreated dermis (baseline), just the resident macrophages CD163<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup> are present and were intracellular stained for TNF-α and MIP-1β (A). Twenty four hours after DNA+EP vaccination, the three CD14<sup>+</sup> populations (CD163<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup> subset 1; CD163<sup>mid</sup>CD11b<sup>high</sup> subset 2; CD163<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> subset 3) present in dermis (B) and the CD163<sup>mid</sup>CD11b<sup>high</sup> subset 2 present in epidermis (C) were intracellular stained for TNF-α and MIP-1β.



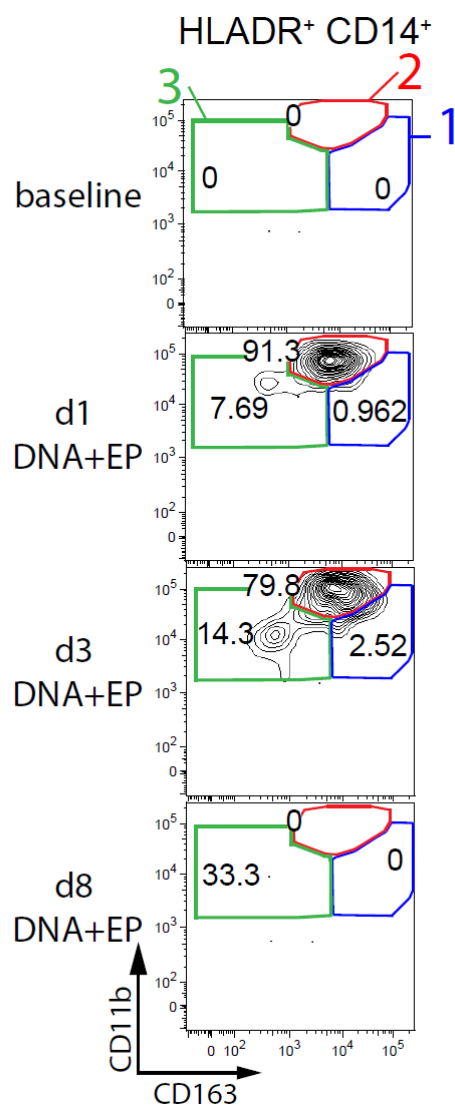
**Figure S1: CD14<sup>+</sup> DDC subset and impact of vaccination on DC subset in dermis.**

CD45<sup>low</sup> cells contain lots of autofluorescent cells (A). Among CD45<sup>low</sup> HLA-DR<sup>+</sup> dermis cells, a CD14<sup>+</sup> subset can be isolated. The back gating of these CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells shows that they express CD45 at low level. These potent CD14<sup>+</sup>DDC express CD11c and HLA-DR but at lower level compare to CD45<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> DDC. Frequencies of CD14<sup>+</sup>DDC, CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> and CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> DDC were measured at baseline, 24h (d1), 72h (d3) and 8 days (d8) after PBS+EP or DNA+EP injections.



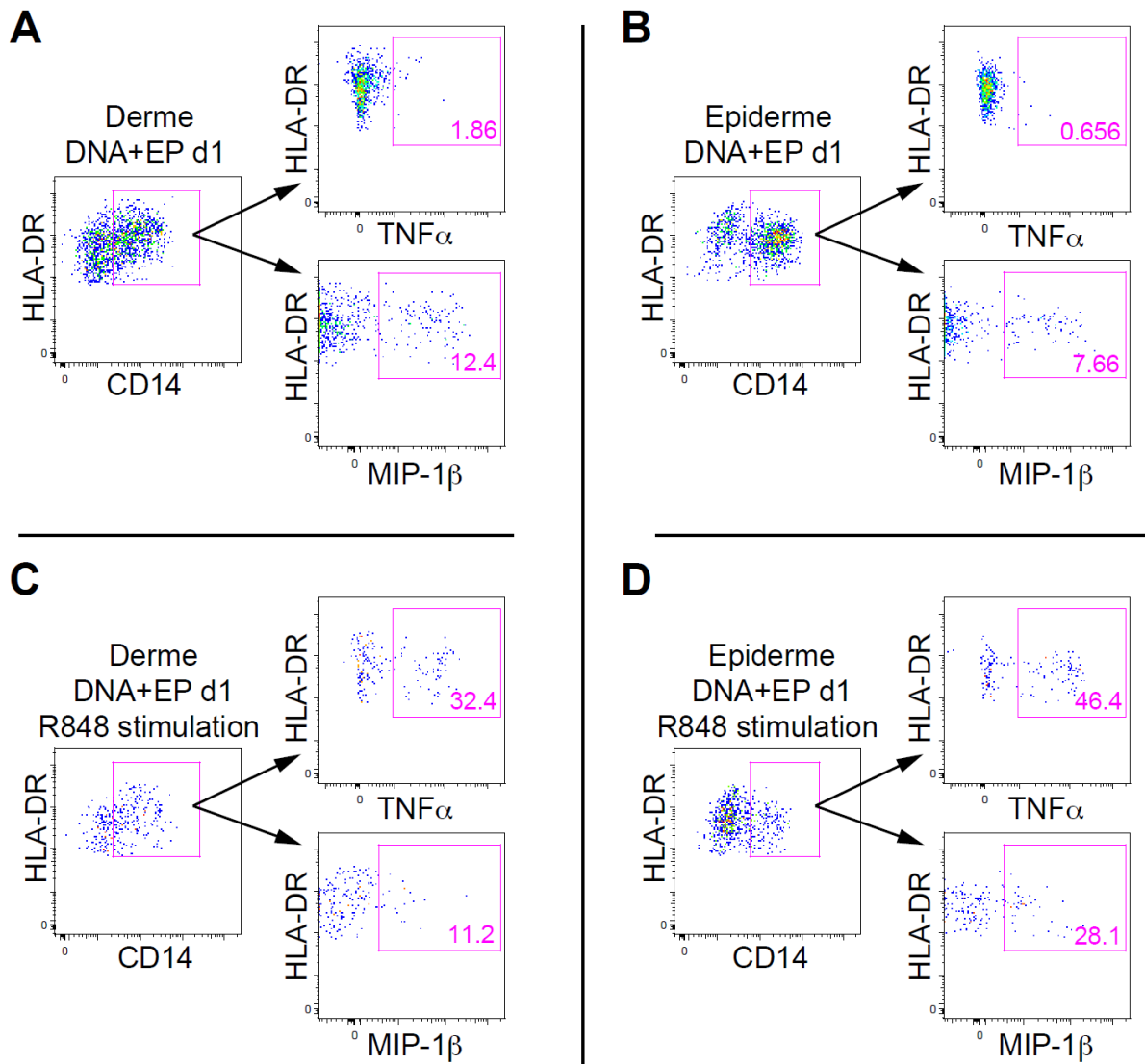
**Figure S2: comparison of CD14<sup>+</sup> blood monocytes and CD14<sup>+</sup> subset in dermis after vaccination.**

One day after DNA+EP vaccination, three subsets of CD14<sup>+</sup> cells were observed in dermis. The CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup> monocytoïd subset closely resemble to CD14<sup>+</sup> blood monocytes.



**Figure S3: recruited-macrophages in epidermis.**

Analysis of CD45<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> macrophages in epidermis cells for CD11b and CD163 surface expression at untreated site (baseline), 24h (d1), 72h (d3) and 8 days (d8) after DNA+EP vaccination.



**Figure S4: macrophages in skin are able to produce TNF- $\alpha$  *in vitro*.**

CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> population of dermis (A) and epidermis (B) were intracellularly stained for TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  24h after DNA+EP immunization. Additional stimulation with R848 was performed *in vitro* to verify the capacity of TNF- $\alpha$  secretion by CD14<sup>+</sup> dermis (C) and epidermis (D) cell populations.

## **Article 4: Macrophage- and Neutrophil-Derived TNF- $\alpha$ Instructs Skin Langerhans Cells to Prime Antiviral Immune Responses**

Olivier Epaulard, Lucille Adam, Candice Poux, Gerard Zurawski, Nina Salabert, Pierre Rosenbaum, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Sandra Zurawski, Sangkon Oh, Gabrielle Romain, Jacques Banchereau, Yves Lévy, Roger Le Grand, et Frédéric Martinon

Actuellement en révision pour « The Journal of Immunology »

Ce manuscrit fait le lien entre l'immunité innée et adaptative au travers de l'étude des mécanismes de l'immunité innée impliqués dans la migration d'une population de cellules dendritiques et le rôle des adjuvants dans l'augmentation de la réponse immunitaire adaptative.

Dans un premier temps, ce manuscrit expose les différences d'intensité de la réponse adaptative suite à une immunisation par voie intradermique (i.d) par la protéine Gag du HIV ou l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe dans différentes conditions et par comparaison au vaccin commercial Vaxigrip®.

Le ciblage spécifique des LC par un anticorps de fusion anti-CD207, marqueur exclusif des LC chez l'homme, lié à la protéine Gag ou HA induit une réponse humorale d'intensité supérieure à celle obtenue par l'immunisation par les protéines Gag ou HA seules, les protéines fusionnées à un isotype contrôle ou même par rapport au vaxigrip®. Ces résultats démontrent l'intérêt du ciblage spécifique d'une population de cellules DC afin d'amplifier la réponse immunitaire induite.

Les adjuvants sont des molécules extrêmement importantes dans la réponse vaccinale. Ils permettent d'obtenir une réponse d'intensité suffisante pour être protectrice (Perrie et al., 2008; Moingeon et al., 2001), tout en permettant de diminuer la quantité d'antigène par dose vaccinale, ce qui est économiquement très favorable. Ils permettent également d'orienter la réponse et d'en accroître l'efficacité, par exemple en facilitant ou accélérant la maturation des effecteur spécifiques. De nombreux adjuvants existent comme les sels d'aluminium, les émulsions huile/eau, qui activent de façon non spécifique l'immunité innée et permettent de prolonger la présence de l'Ag sur le site d'injection. Au cours des dernières années, des adjuvants ayant des propriétés immunomodulatrices plus spécifiques ont été étudiés. Ceux-ci ciblent les TLR et permettent d'activer l'immunité innée de façon plus ciblée (Moingeon et al., 2001).

Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de la réponse innée impliqués localement suite à l'injection par voie intradermique (i.d) de deux ligands de TLR couramment utilisés

dans des études fondamentales et précliniques en tant qu'adjuvant : 1) le Poly (I:C), ligand du TLR3, et 2) le R848, ligand du TLR7/8.

L'injection par voie i.d de poly (I:C) ou de R848 induit une infiltration de granulocytes et de macrophages principalement 24h et 72h post injection. Parallèlement une activation/maturation des LC illustrée par une surexpression des molécules de co-stimulations, de maturation et de récepteurs impliqués dans la migration est observée dès 24h. Cette activation locale des LC est suivie à 72h de leur départ de l'épiderme témoignant de leur migration. Ces deux adjuvants sont donc capables d'induire l'activation des cellules dendritiques, dont les LC, et de provoquer leur migration probablement vers les nœuds lymphatiques drainant le site d'injection.

Nous avons confirmé chez le macaque que l'injection de Poly(I :C), augmentait la réponse induite par les protéines de fusion anit-Langerine-Gag et anti-Langérine-HA.

Dans un troisième temps, ce manuscrit décrit le mécanisme principalement responsable de l'activation et de la migration des LC par le poly (I:C) ou le R848. *In vitro*, nous avons démontré que le R848 et le Poly (I:C) n'ont pas d'effet direct sur les LC, car ils sont incapables d'induire leur activation lorsqu'ils sont ajoutés à une culture de cellules épidermiques contenant des kératinocytes et des LC. Il a en effet été montré que les LC exprimaient un faible niveau de TLR3 et de TLR7 (Flacher et al., 2006). Cependant le R848 active les monocytes/macrophages et les granulocytes, en se fixant sur les TLR7 et 8 exprimés par ces deux espèces cellulaires (Hayashi et al., 2003; Nishiya et al., 2005). Le poly (I:C) active quant à lui uniquement les monocytes/macrophages qui expriment le TLR3 (Nishiya et al., 2005) mais n'a pas d'effet sur les granulocytes qui n'expriment pas ce TLR (Hayashi et al., 2003). Cette activation résulte en une production de nombreux facteurs solubles comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 ou le TNF- $\alpha$ . L'ajout de chacun de ces facteurs solubles à une culture de cellules épidermiques démontre que seul le TNF- $\alpha$  induit la surexpression des molécules d'activation/maturation à la surface des LC, suggérant que le TNF- $\alpha$  est indispensable à la migration des LC comme le montrent également d'autres études (Cumberbatch et al., 1997; Villablanca and Mora, 2008). Finalement, *in vivo* nous avons démontré que l'ajout d'Etanercept, récepteur soluble du TNF- $\alpha$  bloquant son activité, simultanément à l'injection du Poly(I :C) ou du R848, inhibe l'activation des LC et leur départ de l'épiderme ainsi que le recrutement des granulocytes et des macrophages. Ces résultats confirment le rôle principal de ce facteur soluble dans le mécanisme d'activation du système immunitaire par ces deux ligands des TLRs.

Ce manuscrit démontre donc le lien entre l'intensité de l'immunité adaptative induite par une immunisation ciblant les LC et le rôle précoce des acteurs de l'immunité innée dans l'activation et la migration des LC. En effet, l'antigène est adressé au LC grâce à une protéine de fusion. Le R848 et le



Poly (I:C) permettent d'optimiser l'activation de ces cellules ainsi que leur migration par des mécanismes indirects faisant appel au TNF- $\alpha$  sécrété par les cellules inflammatoires de type granulocytes et macrophages en réponse à leur activation directe par ces ligands de TLR.

## Macrophage- and Neutrophil-Derived TNF- $\alpha$ Instructs Skin Langerhans Cells to Prime Antiviral Immune Responses

**Running title:** Mechanisms of antiviral vaccine targeting to Langerhans cells

### Authors

Olivier Epaulard,<sup>\*,†,‡,§</sup> Lucille Adam,<sup>\*,†,‡</sup> Candice Poux,<sup>\*,†,‡</sup> Gerard Zurawski,<sup>‡,¶</sup> Nina Salabert,<sup>\*,†,‡</sup> Pierre Rosenbaum,<sup>\*,†,‡</sup> Nathalie Dereuddre-Bosquet,<sup>\*,†,‡</sup> Sandra Zurawski,<sup>‡,¶</sup> Sangkon Oh,<sup>¶</sup> Gabrielle Romain,<sup>\*,†,‡</sup> Catherine Chapon,<sup>\*,†,‡</sup> Jacques Banchereau,<sup>‡,¶</sup> Yves Lévy,<sup>‡</sup> Roger Le Grand,<sup>\*,†,‡</sup> and Frédéric Martinon<sup>\*,†,‡,||,#</sup>

### Affiliations

\* CEA, Division of Immuno-Virology, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

† UMR E1, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

‡ Vaccine Research Institute (VRI), 94010 Créteil, France.

§ Infectious Diseases Unit; Grenoble University Hospital, 38043 Grenoble, France.

¶ Baylor Institute for Immunology Research, Dallas, TX 75204, USA.

|| Inserm, 75014 Paris, France.

# Correspondence to Dr Frédéric Martinon, CEA, Division of Immuno-Virology, iMETI, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: [frederic.martinon@cea.fr](mailto:frederic.martinon@cea.fr)

## Grant support

This work was supported by the *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales* (ANRS, Paris, France), by the National Institutes of Health prime award No. 2U19AI057234-06 and by ADITEC project funding by the European Commission (grant FP7-HEALTH-2011-280873). O.E. held a fellowship from the ANRS. L.A. held fellowships from Sidaction (Paris, France) and the *Fonds Pierre Bergé* (Paris, France). G.R. held fellowships from the ANRS and Sidaction.

## Abbreviations used in this article

DC, dendritic cell; HA, hemagglutinin; HAI, hemagglutination inhibition; i.d., intradermal; LC, Langerhans cell; NHP, nonhuman primate; PMN, polymorphonuclear neutrophil; poly(I:C), polyriboinosinic polyribocytidylic acid; TLR-L, TLR ligand;

**Abstract**

Dendritic cells (DCs) are major antigen presenting cells that can efficiently prime immune responses. However, the roles of skin resident Langerhans cells (LCs) in eliciting immune responses have not been fully understood. We here demonstrate for the first time that LCs in cynomolgus macaque skin are capable of inducing antiviral-specific immune responses *in vivo*. Targeting HIV-Gag or influenza hemagglutinin antigens to skin LCs using recombinant fusion proteins of anti-Langerin antibody and antigens resulted in the induction of the viral antigen-specific responses. We further demonstrated that such antigen-specific immune responses elicited by skin LCs were greatly enhanced by TLR ligands (TLR-Ls), polyribonucleic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) and R848. These enhancements were not due to the direct actions of TLR-Ls on LCs, but mainly dependent on TNF- $\alpha$  secreted from macrophages and neutrophils recruited to local tissues. Skin LC activation and migration out of the epidermis are timely associated with macrophage and neutrophil infiltration into the tissues. More importantly, blocking TNF- $\alpha$  abrogated the activation and migration of skin LCs. This study highlights that the cross-talk between innate immune cells in local tissues is an important component for the establishment of adaptive immunity. Understanding the importance of local immune network will help us to design new and effective vaccines against microbial pathogens.

## Introduction

The skin is an important site for vaccine delivery. Anti-smallpox vaccine, the most successful vaccine ever in humans, was administered by skin scarification or puncture, and the bacille Calmette-Guerin vaccine and new commercial anti-influenza vaccines are injected intradermally (1). In steady state, human skin contains many cells specializing in immune-surveillance, including CD1a and langerin-expressing Langerhans cells (LCs) in the epidermis and CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) and macrophages in the dermis (2). CD141<sup>high</sup> DCs originating from the blood also have enhanced cross-presenting capabilities (3). These various cell subsets in the skin sample antigens in their environment by diverse mechanisms. They are activated by “danger signals”, leading to their migration to the draining lymph nodes to interact with antigen-specific T and B lymphocytes, resulting in the priming and induction of adaptive immune responses. Different specific immune response profiles may be generated by different DC subsets or may result from DC plasticity upon antigen encounter and activation signals. These properties could be exploited in new generations of vaccines designed to enhance, redirect and fine-tune the desired immune response (4-6). We recently reported, in nonhuman primates (NHPs), which have an immune system similarly organized to humans, that targeting the same antigen to different C-type lectin receptors expressed by skin DCs results in different T helper cells secreting IL-10 or IFN- $\gamma$  (7). However, despite the accumulation of substantial amounts of knowledge from *in vitro* and mouse models over the last 10 years, little is known about the mechanisms of vaccine interaction with primate DCs *in vivo*, in the skin microenvironment. The translation of this new concept into the rational design of human vaccines will require detailed characterization of complex cascades of events at the injection site and in peripheral tissues following the injection of vaccine antigens and adjuvants.

NHP and human DCs have very similar distributions and functions (8-10). *In vitro*, LCs loaded with antigens, through incubation with soluble peptides or infection with viral vectors, prime naïve T cells efficiently. In humans, LCs extracted from the epidermis efficiently induce mixed lymphocyte reactions and trigger the production of Th1 and Th2 cytokines by CD4<sup>+</sup> T cells (11, 12). CD14<sup>+</sup> dermal DCs prime T cells less efficiently than LCs, providing a strong rationale for using fusions of a vaccine antigen to anti-langerin Abs to target LCs *in vivo*.

TLR ligands (TLR-Ls) have been reported to be essential for the efficacy of DC-targeted vaccines and are certainly major players in immune response polarization. TLRs bind pathogen-associated molecular patterns, such as double-stranded RNA, single-stranded RNA and microbial DNA. Such interaction with specific ligands induces the activation of TLR-expressing cells in the skin, such as DCs, macrophages and inflammatory cells (13, 14). Synthetic TLR agonists have therefore been designed for use as vaccine adjuvants. Their use intensifies Th1- and Th2-oriented immune responses (15-17). However, as for skin DCs, little is known about the cellular and molecular events occurring at the site of TLR-L injection. We show here that langerin-targeted vaccines can efficiently prime antigen-specific immune responses in NHP that could be enhanced by a synthetic dsRNA, polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)), which is a TLR3 agonist. We also deciphered the in situ mechanisms underlying the activation and migration of LCs triggered by poly(I:C) or resiquimod (R848), which acts as a ligand of TLR7/8.

## Materials and Methods

### Animals

Adult male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) imported from Mauritius and weighing 4 to 8 kg were housed in CEA facilities (accreditation no.: B 92-032-02) and handled (investigator accreditation no.: RLG, B 92-073; FM, C 92-241) in accordance with European guidelines for NHP care (EU Directive N 2010/63/EU). Before the start of the study, the animals were tested and found to be seronegative for several pathogens (SIV, STLV, filovirus, HBV, herpes B and measles). Animals were sedated with ketamine chlorhydrate (10–20 mg/kg, Rhone-Mérieux, Lyon, France) during handling. Animals were euthanized by sedation with ketamine followed by i.v. injection of a lethal dose of sodium pentobarbital. The regional animal care and use committee (*Comité Régional d’Ethique Ile de France Sud*, reference 12-013) and the Baylor Research Institute animal care and use committee (reference A10-015) have reviewed and approved this study.

### Reagents

R848 and high-molecular weight (HMW) poly(I:C) were purchased from InvivoGen (San Diego, CA). R848 (resiquimod) is an imidazoquinoline compound binding TLR7 and TLR8. HMW poly(I:C) is a synthetic analog of double-stranded RNA (dsRNA), with a mean size of 1.5 to 8 kb, that binds TLR3. Anti-DC receptor and control Ab Gag (p24) and influenza virus hemagglutinin (HA) (strain A/PR/8/34) fusion proteins were prepared as described in Flamar et al. (18), except that the anti-CD207 mAb fusions used variable regions derived from an in-house anti-human langerin hybridoma (15B10). The 15B10 mAb has cross-reactivity to macaque langerin identical to the previously described anti-langerin 2G3 mAb. Influenza A/PR/8/34 virus (kindly provided by Dr. N Naffakh, Institut Pasteur, Paris, France) was injected i.m. at a dose of  $10^8$  pfu/animal, in 1 ml of PBS, on day 0 of the experiment. Vaxigrip® (Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) is a trivalent, inactivated, split influenza virus vaccine that has been produced each year since 1968 in accordance with World Health Organization and European Commission recommendations for seasonal influenza vaccination. The batch (B0566M1) used in this study included the influenza virus strain A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), which has an HA protein 86.549% identical to that of the A/PR/8/34 strain. It was injected i.m. into control animals in weeks 11 and 17. Recombinant human TNF- $\alpha$ , human IL-1 $\beta$ , human IL-6, human MIP1- $\alpha$ , and MIP1- $\beta$  were purchased from

PeptoTech (Rocky Hill, NJ). Recombinant human IL-8 was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). The effects of TNF- $\alpha$  were blocked with etanercept (Enbrel<sup>®</sup>, Pfizer, New York, NY), a dimeric soluble recombinant form of the extracellular domain of the human p75 TNF receptor fused to the Fc fragment of human IgG1.

### **Intradermal injections and biopsies**

We injected 200  $\mu$ g of R848 or poly(I:C) in 100  $\mu$ l of PBS, or PBS alone, by intradermal (i.d.) route into the backs of the animals, via a 29-gauge needle. Punch biopsies (8 mm in diameter) were performed on anesthetized animals 1, 3 or 8 days after injections. We added 1 mg of etanercept where indicated. In all cases, the final volume injected i.d. was 100  $\mu$ l per injection.

### **Skin antigen-presenting cell extraction**

Cells were extracted from fresh skin biopsy specimens with modified versions of published protocols (19, 20). Briefly, the subcutaneous fat was removed and the specimen was then incubated with 4 mg/ml bacterial protease dispase grade II (Roche Diagnostic, Meylan, France) in PBS for 12 to 16 hours at 4°C and then for 2 hours at 37°C, to facilitate separation of epidermal and dermal sheets. The epidermis was then incubated with 0.25% trypsin (Eurobio, Courtaboeuf, France) for 20 minutes at room temperature. The dermis was incubated with 2 mg/ml type D collagenase (Roche Diagnostic, Meylan, France) in RPMI at 37°C for 1 hour, with shaking. Each resulting cell suspension was passed through a filter with 100  $\mu$ m pores before use.

### **Flow cytometry analysis**

Cell mortality was assessed with a blue fluorescent reactive dye from the LIVE/DEAD<sup>®</sup> Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen Life Technology, Paisley, UK). FcRs and other nonspecific binding sites were blocked by incubation with a 5% solution of pooled macaque sera. The details on Abs used are listed in Table 1. Fluorochrome-free Abs were detected with either PE-labeled goat anti-mouse secondary Ab (Jackson, Newmarket, UK) (for anti-CD207 mAb) or a secondary Ab coupled to an Alexa Fluor fluorochrome, with the Zenon kit (Invitrogen Life Technology, Paisley, UK). Acquisition was performed on an LSRFortessa or



an LSRII cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The data obtained were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### **Immunohistofluorescence staining**

Fresh skin biopsy specimens were flash-frozen in a liquid nitrogen bath. Sections were cut, stained with the Abs listed above conjugated with Alexa Fluor fluorochromes and mounted in DAPI-containing mounting medium (Invitrogen Life Technology).

### ***In vivo* immunohistofluorescence staining**

The human anti-CD207 mAb coupled to HIV-gag protein, its control isotype IgG4-gag, and the Gag protein, were provided by the Baylor institute for immunology research (BIIR, Dallas). Fluorescent labeling of these fusion proteins and the anti-HLA-DR mAb (clone L243, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) were performed using respectively Fluoprobe 682 (F682) and 490 (F490) kits (Interchim, Montluçon, France). Ten µg of IgG4-Gag-F682 mAb, anti-Lang-Gag-F682 mAb, or Gag-F682 protein were injected i.d. with 10 µg of anti-HLA-DR-F490 mAb in 100 µl of PBS solution in adult NHP under anesthesia. The injection sites were surgically removed 2 hours after *in vivo* i.d. injection of fluorescent mAbs. Each skin biopsy was placed in a 6-well plate (MatTek Corporation, Ashland, USA) in contact with RPMI-1640 containing 100 µg/ml of Penicillin/Streptomycin/Neomycin and 5% FCS to analyze dermis and epidermis. Fluorescent images were captured through a Plan Fluor 20x DIC objective (NA: 0.45) on a Nikon A1R confocal laser scanning microscope system attached to an inverted ECLIPSE Ti (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) thermostated at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### **Immunizations**

Groups of three to six cynomolgus macaques underwent inoculation, in weeks 0, 6 and 15, with 1 ml (10 i.d. injections of 100 µl) of the indicated vaccine preparation. Each preparation contained 62.5 µg of HIV Gag protein, corresponding to 250 µg of total protein when associated with Abs in fusion proteins. Poly(I:C) was added at a final concentration of 125 µg/ml where indicated. Sera were collected from vaccinated animals for the titration of Gag-specific Abs with the Gag-specific IgG Ab ELISA assay as described (18). Immunization

groups were designed according to MHC genotypes of animals (Supplemental Fig. S1). Groups of four NHPs primed with influenza A/PR/8/34 virus underwent inoculation, in weeks 11 and 17, with adjuvanted anti-langerin-HA vaccine (containing 62.5 µg of HA protein, corresponding to 250 µg of total protein when associated with Abs in fusion proteins, supplemented with 125 µg of poly(I:C)) or with Vaxigrip®. Sera were collected for titration of hemagglutination inhibition (HAI) as described (18).

### **In vitro stimulation of granulocytes, monocytes and LCs**

Granulocytes were isolated from freshly drawn blood by Ficoll-based separation (lymphocyte separation medium, Eurobio, Courtaboeuf, France) to eliminate platelets and mononuclear cells and by lysing erythrocytes with a hypotonic solution. Granulocytes typically account for 90% of the residual cells in flow cytometry analyses. Monocytes were separated from PBMCs by adhesion, as previously described (21). Typically, 80 to 90% of these cells were HLA-DR<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>, the remaining 10 to 20% being mostly lymphocytes. Granulocytes or monocytes were stimulated in vitro, in 24-well culture plates, by incubating 10<sup>6</sup> granulocytes per well with 2 ml of complete medium (RPMI GlutaMax supplemented with 5% heat inactivated macaque serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin) or 10<sup>5</sup> monocytes per well with 150 µl of complete medium, with or without 10 µg/ml R848 or poly(I:C), for 16 h before harvesting the supernatant. Concentrations of GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23 (p40), IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, MIP-1α, MIP-1β and TNF-α in the supernatants were determined with the Milliplex MAP NHP Immunoassay kit (Millipore, Billerica, MA). LCs were stimulated by dispensing 10<sup>6</sup> cells resulting from enzymatic disruption of the epidermis into a well containing 2 ml of complete medium with or without 10 µg/ml R848 or poly(I:C), or 1 ml of complete medium plus 1 ml of supernatant from the granulocyte and monocyte stimulation experiments described above, with or without 200 µg/ml etanercept, in a 24-well plate. Alternatively, epidermal cells were incubated in complete medium supplemented with the following human cytokines at a concentration of 20 ng/ml: TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, MIP-1α or MIP-1β. After incubation for 16 h, LC activation/maturation status was assessed by flow cytometry analysis of the surface expression of CD80, CD83, and CD86.

**Statistical analysis**

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD unless specified in figure legends. Statistical analyses were performed with Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) software, using the appropriate nonparametric test: Wilcoxon paired, Mann-Whitney unpaired or Spearman's correlation tests.

## Results

### A langerin-targeting vaccine primes an antigen-specific antiviral response in NHP

We have shown that LCs can prime antigen-specific immune responses in in vitro models and humanized mice (12, 18, 22). We assessed the concept of a vaccine targeting langerin (CD207)-expressing cells, by generating anti-langerin Abs fused to HIV Gag or influenza H1N1 HA viral antigens, which we tested in cynomolgus macaques. NHPs are recognized to be a more relevant model than mice for the testing of human vaccines. We have previously demonstrated that NHP and human DC subsets have similar tissue distributions and differentiation and activation markers, including C-type lectin receptors (9). Diverse DC populations can be identified in the macaque skin: LCs, which express langerin (CD207), are found exclusively in the epidermis while DC expressing DC-SIGN (CD209) are localized in the dermis (Fig. 1A). CD209 may also stain activated dermal macrophages. LCs also express high levels of CD1a and form a network in the epidermis with 300 to 1,000 cells per cm<sup>2</sup> (Fig. 1A). At steady state, they are characterized as CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD1a<sup>high</sup>CD207<sup>high</sup> and account for 0.71%±0.23% (n=12) of all epidermal cells (Fig. 1B). NHP LCs do not express CD14 and CD163 on their membranes and display only low levels of CD209 expression. In the dermis, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells include macrophages and DCs, but no CD207<sup>+</sup> cells (Fig. 1C). Dermal macrophages are CD11c<sup>low</sup>CD163<sup>+</sup> and account for 1.48%±0.70% (n=18) of all cells at steady state. Similar findings have been reported for human skin (2). Dermal DCs (CD11c<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup>) comprise at least two distinct populations expressing intermediate levels of CD1a (0.60%±0.39%, n=12) or CD14 (2.20%±1.45%, n=12). As previously reported (23), only a small proportion (0.88%±0.45%, n=13) of CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> dermal cells are polymorphonuclear cells expressing CD66abce (Fig. 1C). The anti-langerin mAb that we have developed to target human epidermal LCs also recognized the LCs of cynomolgus macaques (Fig. 1A and B). This anti-CD207 mAb, fused to HIV-Gag, was used to immunize NHPs. We demonstrated that this fusion protein specifically targeted the epidermal Langerhans cells. As early as two hours following intradermal injection of the fluorescent labeled fusion protein, the antigen co-localize with almost all HLA-DR dendritic cells of the epidermis (Fig. 2A). There is no antigen associated to other types of epidermal cells. By contrast, none of the IgG4-Gag and Gag proteins injected i.d. as controls appeared to be associated with epidermal DC expressing HLA-DR, demonstrating that only the anti-langerin-Gag fusion protein could specifically target Langerhans cells with very high efficacy. In the dermis, only part of the anti-langerin-

Gag and IgG4-Gag immunogens appeared to co-localize with HLA-DR expressing cells, whereas no co-staining could be evidenced where Gag alone was injected. Three i.d. injections of the anti-langerin-Gag vaccine (250 µg each), at weeks 0, 6 and 15, were sufficient to induce a significant anti-Gag Ab response in NHPs (Fig. 2B). Remarkably, the induction of this response did not require the use of an adjuvant. By contrast, animals injected with HIV-Gag protein alone or with the IgG4-Gag isotype control, in similar molar amounts, displayed significantly weaker responses ( $p=0.038$  and  $p=0.050$  respectively at week 16). Therefore, antigen targeting to skin LCs in vivo has significantly improved efficacy to prime for antigen-specific responses in a relevant model for the testing of human vaccines. The intermediate antibody response induced by the IgG4-Gag (Fig. 2B), could be attributed to a slight binding to dermal HLA-DR<sup>+</sup> dermal cells (Fig. 2A). As expected, Gag injected alone in absence of an adjuvant, is poorly immunogenic, in line with its poor capacity to interact with APC of the dermis and the epidermis.

### **The i.d. injection of TLR ligands favors LC migration and activation**

LCs require costimulatory signals for maturation and migration and for optimal antigen processing and presentation to T and B lymphocytes. We therefore considered the use of synthetic TLR-Ls as immune stimulant to enhance antigen-specific responses in vaccinated NHPs. The targeting of antigens to DCs through DEC205 has been shown to be strongly dependent on the simultaneous administration of TLR3-L in mice (24) and NHPs (25). We confirmed that poly(I:C) also acted as an adjuvant for our anti-langerin-Gag and anti-langerin-HA conjugates. Three i.d. injections of the anti-langerin-Gag vaccine in the presence of poly(I:C) enhanced, although non statistically significant, Gag-specific Ab response in macaques ( $p=0.069$ , Fig. 2C). We assayed recall responses induced by vaccines in human adults exposed to seasonal influenza infections, by injecting the anti-langerin-HA fusion protein into NHPs primed with influenza A/PR/8/34 virus. Two injections (weeks 11 and 17) of the adjuvanted anti-langerin-HA vaccine induced high titers of protective Abs, as demonstrated by measurements of hemagglutination inhibition (HAI) in the serum. These levels are significantly higher ( $p=0.028$ ) than those obtained for control animals primed with A/PR/8/34 and boosted twice with Vaxigrip<sup>®</sup> (Fig. 2D).

The increased responses obtained with the use of poly(I:C) suggested a synergy between the effect of the adjuvant and the targeting of LCs. Information about early cellular and molecular changes at the site of poly(I:C) injection associated with the enhanced immunogenicity of the

vaccine should provide hints for the rational design of future strategies. We studied, in particular, local interactions of R848, a TLR-7/8 agonist, or poly(I:C) with LCs. The i.d. injection of 200 µg of R848 or poly(I:C) induced skin inflammation, which was not seen with an identical volume (100 µl) of PBS used as a control. The staining of skin sections with eosin and hematoxylin 72 h after the injection with R848 revealed perivascular, neutrophilic dermatitis-associated epidermal spongiosis and exocytosis of leukocytes (Fig. 3A). The i.d. injection of 200 µg of poly(I:C) induced similar, but less marked changes.

The density of LCs in the epidermis changed considerably after R848 or poly(I:C) i.d. injection (Fig. 3B). R848 induced an initial small increase in LC number ( $1.19\pm0.32\%$ , at 24 h), which was not statistically significant. However, the numbers of langerin- and CD1a-positive cells were significantly lower 72 hours after injection ( $p=0.0156$ ) than in skin treated with PBS, as a control (Fig. 3C). We excluded the possibility that the disappearance of LCs reflected the down regulation of CD207 only, because CD1a expression was not affected by TLR-L injection (Fig. 3D). Although the macroscopic signs of inflammation at the injection site returned to normal eight days after R848 injection, LC density remained lower compared to PBS injection site ( $0.38\pm0.16\%$  and  $0.99\pm0.60\%$ , respectively, Supplemental Fig. S2). By contrast, the number of CD209<sup>+</sup> dermal cells was similar or slightly higher (not significant). This, marker however cannot discriminate between possible migration of dermal DC out of the skin and recruitment of macrophages.

Similar changes were observed after the i.d. injection of 200 µg of poly(I:C). At 72 h post injection, there were significantly fewer epidermal LCs ( $p=0.0313$ ) than in control skin treated with PBS (Fig. 3C). This smaller number of LCs was associated with lower levels of CD207 expression on the membrane (Fig. 3D), usually linked to LC activation. We confirmed that injections of R848 and poly(I:C) enhanced the expression of LC activation and maturation markers (CD80, CD83, and CD86). The changes observed were more marked 24 h than 72 h after injection (i.e., for the LCs that had not left the epidermis; Fig. 3E). Thus, i.d. injection of TLR7/8-L or TLR3-L clearly induced LC maturation and activation and their migration out of the epidermis.

### **The migration of LCs is associated with the local recruitment of polymorphonuclear cells and macrophages**

HLA-DR<sup>+</sup>CD66<sup>+</sup> polymorphonuclear cells were identified as mostly neutrophils (PMNs) on the basis of their phenotype (HLA-DR<sup>+</sup>CD66<sup>+</sup>FcεR1<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>, Supplemental Fig. S3) and histological features in the skin (Fig. 3A). The i.d. injection of 200 µg of R848 or poly(I:C) was associated with a massive local recruitment of PMNs and macrophages (Fig. 4). Indeed, the frequency of PMNs increased to 8.18%±6.92% at 24 h and 8.52%±12.93% at 72 h after R848 injection, and significantly higher than after PBS injection (p=0.0156 and p=0.0156, respectively). No significant PMN infiltration was observed in PBS-injected skin, as shown by comparison with steady-state skin (p=0.6885 and p=0.4246 at 24 h and 72 h, respectively). Poly(I:C) injection resulted in similar changes with respect to PBS injection (4.19%±2.08%, p=0.0313 at 24 h and 5.02%±2.89%, p=0.0313, at 72 h). Macrophages also infiltrated the skin after injection. PBS alone induced a moderate but significant increase in the proportion of macrophages in the dermis with respect to untreated skin (3.15%±1.36%, p=0.0020 at 24 h and 3.77%±2.49%, p=0.0253 at 72 h). However, R848 injection strongly enhanced macrophage infiltration, as shown by comparison with PBS injection at 24 h (8.41%±2.77%; p=0.0156) and 72 h (10.78%±5.69%; p=0.0313). Similarly, poly(I:C) resulted in higher levels of macrophage infiltration at 24 h (9.30%±5.73%; p=0.0156) and 72 h (8.62%±3.55%; p=0.0313) than PBS injection (Fig. 4B). The decrease in LC density in the epidermis at 72 h was correlated with the recruitment of PMNs to the dermis 24 h after R848 (p=0.0002) and poly(I:C) (p=0.0678) injections. Furthermore, the recruitment of these inflammatory cells was associated with an enhanced expression of CD80, CD83, and CD86 by LCs by 24 hours post injection (Fig. 4C). These findings provide important clues to the effect of R848 and poly(I:C) injections on epidermal LCs. Our observations strongly suggest that PMNs and macrophages recruited to the site of TLR-L injection immediately become involved in the inflammatory cascade triggering LC migration out of the skin. Indeed, R848-associated LC activation and migration appear paradoxical, as several previous studies have shown that these cells do not express TLR7 and TLR8 (26) or that they express these receptors only at very low levels (27). In addition, the direct incubation of epidermal cells extracted from NHP skin (containing keratinocytes and 0.5% to 1% LCs) with 10 µg/ml R848 did not increase the expression of LC activation/maturation markers (Fig. 5A). By contrast, supernatant from freshly isolated blood PMNs and monocytes exposed to 10 µg/ml R848 induced significant levels of LC activation. These data support the hypothesis that both types of inflammatory cells may produce soluble

factors responsible for LC activation and migration. Similarly, poly(I:C) did not directly activate NHP skin LCs *ex vivo*, but supernatants from monocytes stimulated with 10 µg/ml poly(I:C) did. However, supernatants from poly(I:C)-exposed PMNs did not appear to have a significant effect on LC activation. Although these cells are reported to express TLR3 intracellularly (26), our interpretation is that its immature state at time of treatment with poly(I:C) did not allow full signaling for induction of activation markers.

### **TNF- $\alpha$ produced by PMNs and monocytes/macrophages activates LCs**

We analyzed the cytokines produced by granulocytes and monocytes exposed *in vitro* to R848 or poly(I:C). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  were the most abundant factors in supernatants of R848-exposed PMNs and R848- or poly(I:C)-exposed monocytes (Fig. 5B). The lack of LC activation by supernatants from poly(I:C)-incubated PMNs was confirmed by the absence of cytokines into the corresponding supernatants. We then incubated epidermal cells with recombinant forms of each of these cytokines. Only stimulation with TNF- $\alpha$  resulted in the acquisition of a mature/activated profile by LCs *ex vivo*. Incubation with IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$  or MIP-1 $\beta$  had only a moderate impact, if any, on LC activation (Fig. 5C). Moreover, the addition of etanercept (a soluble TNF- $\alpha$  receptor fused to an IgG1 fragment) to supernatants from R848-exposed PMNs and R848- or poly(I:C)-exposed monocytes/macrophages resulted in the complete abolition of LC activation. Altogether, these results indicate that TNF- $\alpha$  is an essential factor in the supernatants for LC activation and maturation. They also strongly suggest that TNF- $\alpha$  secreted by locally recruited PMNs and macrophages may be the key factor in the inflammatory cascade activating LCs after *i.d.* injection of R848 or poly(I:C). We would therefore expect R848 and poly(I:C) to have similar effects *in vivo*, mediated by the secretion of TNF- $\alpha$ , because both PMNs and macrophages are recruited. We therefore injected R848 or poly(I:C) mixed with the anti-TNF- $\alpha$   $\square$  *i.d.* into NHPs. The migration of LCs from the epidermis induced by R848 or poly(I:C) was strongly inhibited by the local neutralization of TNF- $\alpha$  (Fig. 6A). This was confirmed by the lack of LC activation under these conditions (Fig. 6B). Consistently, the increase in the proportion of PMNs and macrophages in the dermis 24 h after TLR-L injection was strongly inhibited by the co-injection of anti- TNF- $\alpha$  (Fig. 6C).



## Discussion

The data reported here highlight the relevance of targeting DCs to improve vaccine efficacy. We provide the first demonstration, in a primate species highly relevant for the evaluation of human vaccines, that direct targeting to LCs is a very efficient strategy for increasing the immunogenicity of viral antigens. Significant specific Ab responses were obtained without the need for an adjuvant, but higher titers were obtained when the antigen fused to the anti-langerin Ab was coinjected with poly(I:C).

The effects of direct antigen targeting to LCs suggest that this DC population plays a specific and active role in triggering the humoral response. Other studies have focused on the use of anti-lectin Abs to target DCs. The incubation of human DCs with anti-DCIR-fused antigen (28) leads to in vitro CD8<sup>+</sup> T-cell cross-priming and the secretion of Th1 cytokines. The addition of TLR7/8-L (CL075) enhanced cross-presentation and cross-priming. In mice (29), skin DCs targeted with a fusion protein consisting of anti-DEC-205 Ab fused to antigen effectively presented antigen to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in vitro. An antigen fused to anti-CD207 Ab has been shown to be cross-presented efficiently in vitro (30) and to induce IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in vivo, in mice without co-administered adjuvant. However, directing antigen specifically to mouse LCs via CD207 Ab, rather than both resident mouse CD207<sup>+</sup> DC populations, evoked antigen-specific CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>, T cell expansion (31). Influenza antigen targeted to mouse CD207<sup>+</sup> DCs raised antigen-specific antibody responses without co-administered adjuvant (18), as did ovalbumin targeted to mouse DCs via Clec9A (32). However, the efficiency of DC-targeted vaccine strategies in the absence of synthetic TLR-Ls co-injected as an immunostimulant had yet to be assessed in NHPs. A pioneering in vitro study of human LCs (12) suggested that LCs were involved in triggering the cytotoxic T lymphocyte response rather than in the humoral response. However, LCs may not be in the same state in vivo and may be influenced differently by the microenvironment. Furthermore, when LCs are targeted in vivo, the intracellular signal delivered via the membrane receptor may strongly influence the resulting immune response, as suggested for mouse LCs (29) and NHP DCs (7).

We demonstrate here that i.d. injection of R848 or poly(I:C) induces the activation/maturation of LCs and their migration out of the skin in vivo. Studies in mice and with human skin had shown that LC activation was triggered by exposure to allergens (33), virus-like particles (34) or imiquimod (35). However, human LCs do not produce TLR7 or TLR8 mRNA (27) and do not respond directly to TLR7/8-Ls (26). It is, therefore, likely that other cell populations are

locally activated by R848 and produce signals that then activate LCs. We observed a correlation between LC migration and the local recruitment of PMNs and macrophages, suggesting that these cells act as “go-betweens”. Moreover, skin LCs are activated by the supernatants of PMNs exposed to R848 or monocytes exposed to R848 or poly(I:C), confirming the role of these inflammatory cells in the adjuvant effect of these two TLR-Ls.

This role of PMNs is consistent with their expression of TLR8 and TLR7 (36), and their recruitment and activation by R848 in humans (13, 37) and in NHPs (38). The coincidence of a decrease in LC density in the epidermis and the local recruitment of granulocytes has already been observed in response to other stimuli, during aminolevulinic acid–photodynamic therapy for example (39). Direct interplay between LCs and granulocytes has also been suggested by previous studies. Indeed, mast cell-deficient mice (*Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>*) were shown to display lower levels of LC emigration from the epidermis following R837 local application than control mice (40). In the anti-tumor vaccine mouse model based on CD95L-overexpressing ex vivo-generated DCs, massive PMN infiltration was observed at the injection site (41), and such infiltration was shown to be required for tumor regression. In vitro, PMNs could induce the activation of monocyte-derived DCs (42) by both soluble factors and cell-to-cell contact. These findings, combined with our data, provide strong support for the hypothesis that granulocytes are involved in the generation of vaccine-induced adaptive immune responses, through the delivery of activation signals to DCs (including LCs) at the immunization site. This implies that PMN activation is beneficial during the vaccination process, and that adjuvants could be selected on the basis of their effect on PMNs.

The effect of poly(I:C) probably involves more complex interactions. Flacher et al. reported that LCs were activated by poly(I:C) (26) although this was not confirmed in our study or in previous works (43). Differences in TLR-L doses and in the origin and purity of the cell populations used may account for these discrepancies. Keratinocytes and inflammatory cells, such as macrophages which express TLR3 to significant levels, may play a predominant role in the adjuvant effect observed with poly(I:C) (43). Further evidence for the predominant role of macrophages is provided by the demonstration that poly(I:C) can activate macrophages in different ways, including TLR3-independent Mac-1 antigen-binding (44). PMNs do not express TLR3 (45) which explains the weak activation and low cytokine levels of LCs incubated with poly(I:C)-exposed granulocyte supernatants.

The TNF- $\alpha$  produced by PMNs and macrophages seems to be a major factor in LC activation. We and others (46) have shown that the TNF- $\alpha$ -dependent activation of LCs leads to their

migration. However, it may also activate dermal cells, such as fibroblasts, which, in turn, secrete CCL2 and CCL5, favoring LC migration (47). Alternatively, TLR-L injections may stimulate TNF- $\alpha$  production by keratinocytes (48). However, keratinocytes do not express TLR7/8 (49-51) and do not secrete cytokines when exposed to TLR7/8 ligands in vitro (52). Keratinocytes express TLR3 (43, 52), but they may nevertheless not be the main source of TNF- $\alpha$  in the inflammatory processes reported here, because we did not observe LC activation when total epidermal cells, consisting mostly of keratinocytes, were exposed to R848 or poly(I:C) ex vivo. Dermal DCs may also participate to the production of TNF- $\alpha$ , after i.d. injection of TLR-L. Indeed, the stimulation of these cells by poly(I:C) have been demonstrated to lead to the production of TNF- $\alpha$  (3). Nevertheless, the low frequency of the dermal DCs and the moderate amount of TNF- $\alpha$  produced suggest a minor contribution of these cells in the activation of LCs in comparison to PMN and macrophages in inflammatory conditions.

In conclusion, we demonstrate here that R848 and poly(I:C) activate LCs in vivo mostly indirectly, by activating innate immune cells (PMNs and macrophages). The secretion of TNF- $\alpha$ , a cytokine already known to interfere with vaccine-induced specific responses (53-55), plays a predominant role in this process. Finally, we also provide evidence that the specific targeting of antigens to LCs can increase vaccine efficacy. Such an approach, in combination with carefully designed adjuvant strategies, could be used to increase vaccine potency and safety, whilst minimizing the doses of vaccines and adjuvants required.

**Acknowledgments**

This work benefited from the technical support of the core laboratory (TIPIV) of the Division of Immuno-Virology (CEA), for the immune monitoring of animals and flow cytometry analysis (FlowCyTech). We thank S. Bernard-Stoecklin, T. Bruel, V. Contreras, and L. Gosse (Division of Immuno-Virology, CEA) for helpful discussions. We thank C. Joubert and J.M. Helies, veterinary surgeons, for the supervision and assistance with animal care; A.L. Bauchet (MIRCen, CEA) for assistance with histology; X-H. Li, A-L. Flamar and M. Montes (BIIR) for helping prepare and validate the Ab-antigen fusion proteins; and Shannon Lunt (BIIR) for help with samples.

# References

1. Frenck, R. W., Jr., R. Belshe, R. C. Brady, P. L. Winokur, J. D. Campbell, J. Treanor, C. M. Hay, C. L. Dekker, E. B. Walter, Jr., T. R. Cate, K. M. Edwards, H. Hill, M. Wolff, T. Leduc, and N. Tornieporth. 2011. Comparison of the immunogenicity and safety of a split-virion, inactivated, trivalent influenza vaccine (Fluzone(R)) administered by intradermal and intramuscular route in healthy adults. *Vaccine* 29: 5666-5674.
2. Haniffa, M., F. Ginhoux, X. N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilkens, M. Merad, and M. Collin. 2009. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* 206: 371-385.
3. Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X. N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37: 60-73.
4. Palucka, K., H. Ueno, J. Fay, and J. Banchereau. 2009. Harnessing dendritic cells to generate cancer vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 1174: 88-98.
5. Romani, N., V. Flacher, C. H. Tripp, F. Sparber, S. Ebner, and P. Stoitzner. 2012. Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 351: 113-138.
6. Sparber, F., C. H. Tripp, M. Hermann, N. Romani, and P. Stoitzner. 2010. Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology* 215: 770-779.
7. Li, D., G. Romain, A. L. Flamar, D. Duluc, M. Dullaers, X. H. Li, S. Zurawski, N. Bosquet, A. K. Palucka, R. Le Grand, A. O'Garra, G. Zurawski, J. Banchereau, and S. Oh. 2012. Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J Exp Med* 209: 109-121.
8. Malleret, B., B. Maneglier, I. Karlsson, P. Lebon, M. Nascimbeni, L. Perie, P. Brochard, B. Delache, J. Calvo, T. Andrieu, O. Spreux-Varoquaux, A. Hosmalin, R. Le Grand, and B. Vaslin. 2008. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* 112: 4598-4608.
9. Romain, G., E. van Gulck, O. Epaulard, S. Oh, D. Li, G. Zurawski, S. Zurawski, A. Cosma, L. Adam, C. Chapon, B. Todorova, J. Banchereau, N. Dereuddre-Bosquet, G. Vanham, R. Le Grand, and F. Martinon. 2012. CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur J Immunol* 42: 2019-2030.
10. Wonderlich, E. R., M. Kader, V. Wijewardana, and S. M. Barratt-Boyes. 2011. Dissecting the role of dendritic cells in simian immunodeficiency virus infection and AIDS. *Immunol Res* 50: 228-234.

11. Furio, L., I. Briotet, A. Journeaux, H. Billard, and J. Peguet-Navarro. 2010. Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol* 130: 1345-1354.
12. Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, A. K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29: 497-510.
13. Hattermann, K., S. Picard, M. Borgeat, P. Leclerc, M. Pouliot, and P. Borgeat. 2007. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis. *Faseb J* 21: 1575-1585.
14. Makela, S. M., M. Strengell, T. E. Pietila, P. Osterlund, and I. Julkunen. 2009. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 85: 664-672.
15. Adams, S., D. W. O'Neill, D. Nonaka, E. Hardin, L. Chiriboga, K. Siu, C. M. Cruz, A. Angiulli, F. Angiulli, E. Ritter, R. M. Holman, R. L. Shapiro, R. S. Berman, N. Berner, Y. Shao, O. Manches, L. Pan, R. R. Venhaus, E. W. Hoffman, A. Jungbluth, S. Gnjjatic, L. Old, A. C. Pavlick, and N. Bhardwaj. 2008. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J Immunol* 181: 776-784.
16. Kawai, T., and S. Akira. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-650.
17. Zhang, W. W., and G. Matlashewski. 2008. Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against Leishmania major in BALB/c mice. *Infect Immun* 76: 3777-3783.
18. Flamar, A. L., S. Zurawski, F. Scholz, I. Gayet, L. Ni, X. H. Li, E. Klechevsky, J. Quinn, S. Oh, D. H. Kaplan, J. Banchereau, and G. Zurawski. 2012. Noncovalent assembly of anti-dendritic cell antibodies and antigens for evoking immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 189: 2645-2655.
19. Bond, E., W. C. Adams, A. Smed-Sorensen, K. J. Sandgren, L. Perbeck, A. Hofmann, J. Andersson, and K. Lore. 2009. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *J Immunol Methods* 348: 42-56.
20. Stoitzner, P., N. Romani, A. D. McLellan, C. H. Tripp, and S. Ebner. 2009. Isolation of Skin Dendritic Cells from Mouse and Man. In *Dendritic Cell Protocols*. S. H. Naik, ed. Humana Press. 235-248.
21. Rimaniol, A. C., G. Gras, F. Verdier, F. Capel, V. B. Grigoriev, F. Porcheray, E. Sauzeat, J. G. Fournier, P. Clayette, C. A. Siegrist, and D. Dormont. 2004. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine* 22: 3127-3135.
22. Banchereau, J., L. Thompson-Snipes, S. Zurawski, J. P. Blanck, Y. Cao, S. Clayton, J. P. Gorvel, G. Zurawski, and E. Klechevsky. 2012. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood* 119: 5742-5749.

23. Gray-Owen, S. D., and R. S. Blumberg. 2006. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 433-446.
24. Trumpfheller, C., M. Caskey, G. Nchinda, M. P. Longhi, O. Mizenina, Y. Huang, S. J. Schlesinger, M. Colonna, and R. M. Steinman. 2008. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4<sup>+</sup> T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2574-2579.
25. Flynn, B. J., K. Kastenmuller, U. Wille-Reece, G. D. Tomaras, M. Alam, R. W. Lindsay, A. M. Salazar, B. Perdiguero, C. E. Gomez, R. Wagner, M. Esteban, C. G. Park, C. Trumpfheller, T. Keler, G. Pantaleo, R. M. Steinman, and R. Seder. 2011. Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7131-7136.
26. Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronese, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol* 177: 7959-7967.
27. van der Aar, A. M., R. M. Sylva-Steenland, J. D. Bos, M. L. Kapsenberg, E. C. de Jong, and M. B. Teunissen. 2007. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* 178: 1986-1990.
28. Klechevsky, E., A. L. Flamar, Y. Cao, J. P. Blanck, M. Liu, A. O'Bar, O. Agouna-Deciat, P. Klucar, L. Thompson-Snipes, S. Zurawski, Y. Reiter, A. K. Palucka, G. Zurawski, and J. Banchereau. 2010. Cross-priming CD8<sup>+</sup> T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 116: 1685-1697.
29. Flacher, V., C. H. Tripp, P. Stoitzner, B. Haid, S. Ebner, B. Del Frari, F. Koch, C. G. Park, R. M. Steinman, J. Idoyaga, and N. Romani. 2010. Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J Invest Dermatol* 130: 755-762.
30. Idoyaga, J., C. Cheong, K. Suda, N. Suda, J. Y. Kim, H. Lee, C. G. Park, and R. M. Steinman. 2008. Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products in vivo. *J Immunol* 180: 3647-3650.
31. Igyarto, B. Z., K. Haley, D. Ortner, A. Bobr, M. Gerami-Nejad, B. T. Edelson, S. M. Zurawski, B. Malissen, G. Zurawski, J. Berman, and D. H. Kaplan. 2011. Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* 35: 260-272.
32. Caminschi, I., A. I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J. C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S. L. van Dommelen, I. K. Campbell, E. Maraskovsky, H. Braley, G. M. Davey, P. Mottram, N. van de Velde, K. Jensen, A. M. Lew, M. D. Wright, W. R. Heath, K. Shortman, and M. H. Lahoud. 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112: 3264-3273.
33. Ouwehand, K., S. J. Santegoets, D. P. Bruynzeel, R. J. Scheper, T. D. de Gruijl, and S. Gibbs. 2008. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur J Immunol* 38: 3050-3059.

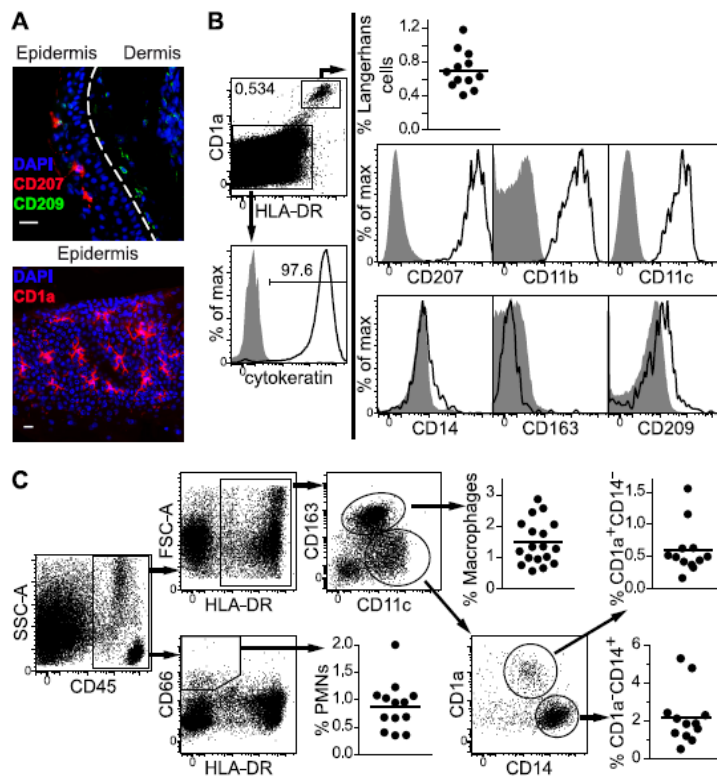
34. Pearnton, M., S. M. Kang, J. M. Song, A. V. Anstey, M. Ivory, R. W. Compans, and J. C. Birchall. 2010. Changes in human Langerhans cells following intradermal injection of influenza virus-like particle vaccines. *PLoS One* 5: e12410.
35. Suzuki, H., B. Wang, G. M. Shivji, P. Toto, P. Amerio, M. A. Tomai, R. L. Miller, and D. N. Sauder. 2000. Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 114: 135-141.
36. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102: 2660-2669.
37. Lefebvre, J. S., S. Marleau, V. Milot, T. Levesque, S. Picard, N. Flamand, and P. Borgeat. 2010. Toll-like receptor ligands induce polymorphonuclear leukocyte migration: key roles for leukotriene B4 and platelet-activating factor. *Faseb J* 24: 637-647.
38. Kwissa, M., H. I. Nakaya, H. Oluoch, and B. Pulendran. 2012. Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood* 119: 2044-2055.
39. Evangelou, G., M. D. Farrar, R. D. White, N. B. Sorefan, K. P. Wright, K. McLean, S. Andrew, R. E. Watson, and L. E. Rhodes. 2011. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy produces an inflammatory infiltrate but reduces Langerhans cells in healthy human skin in vivo. *Br J Dermatol* 165: 513-519.
40. Heib, V., M. Becker, T. Warger, G. Rechtsteiner, C. Tertilt, M. Klein, T. Bopp, C. Taube, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2007. Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* 110: 946-953.
41. Buonocore, S., F. Paulart, A. Le Moine, M. Braun, I. Salmon, S. Van Meirvenne, K. Thielemans, M. Goldman, and V. Flamand. 2003. Dendritic cells overexpressing CD95 (Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses in vivo. *Blood* 101: 1469-1476.
42. Megiovanni, A. M., F. Sanchez, M. Robledo-Sarmiento, C. Morel, J. C. Gluckman, and S. Boudaly. 2006. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 79: 977-988.
43. Iram, N., M. Mildner, M. Prior, P. Petzelbauer, C. Fiala, S. Hacker, A. Schoppl, E. Tschachler, and A. Elbe-Burger. 2012. Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin. *Development* 139: 4210-4219.
44. Zhou, H., J. Liao, J. Aloor, H. Nie, B. C. Wilson, M. B. Fessler, H. M. Gao, and J. S. Hong. 2013. CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses. *J Immunol* 190: 115-125.
45. Parker, L. C., M. K. Whyte, S. K. Dower, and I. Sabroe. 2005. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 77: 886-892.
46. Cumberbatch, M., C. E. Griffiths, S. C. Tucker, R. J. Dearman, and I. Kimber. 1999. Tumour necrosis factor-alpha induces Langerhans cell migration in humans. *Br J Dermatol* 141: 192-200.



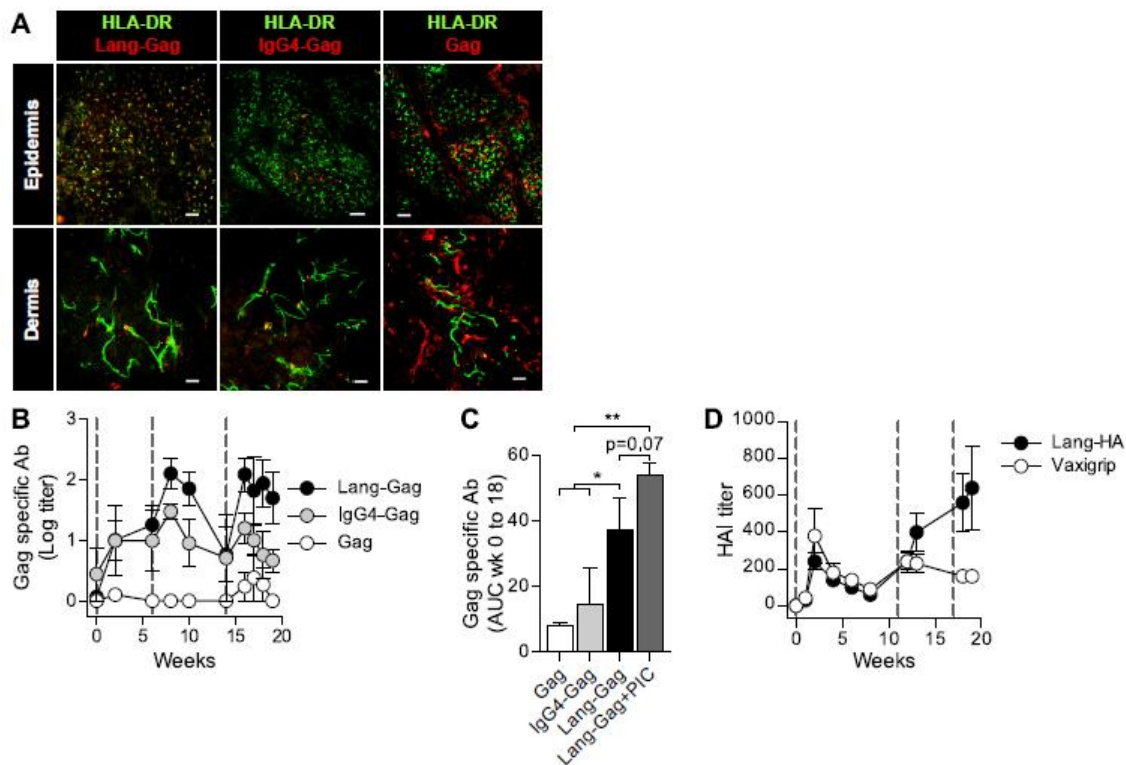
47. Ouwehand, K., R. J. Scheper, T. D. de Gruijl, and S. Gibbs. 2010. Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5. *Eur J Immunol* 40: 2026-2034.
48. Nestle, F. O., P. Di Meglio, J. Z. Qin, and B. J. Nickoloff. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679-691.
49. Lebre, M. C., A. M. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. van Capel, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 127: 331-341.
50. Miller, L. S. 2008. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol* 24: 71-87.
51. Olaru, F., and L. E. Jensen. 2010. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol* 19: e314-316.
52. Kollisch, G., B. N. Kalali, V. Voelcker, R. Wallich, H. Behrendt, J. Ring, S. Bauer, T. Jakob, M. Mempel, and M. Ollert. 2005. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 114: 531-541.
53. Farmaki, E., F. Kanakoudi-Tsakalidou, V. Spoulou, M. Trachana, P. Pratsidou-Gertsis, M. Tritsoni, and M. Theodoridou. 2010. The effect of anti-TNF treatment on the immunogenicity and safety of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in children with juvenile idiopathic arthritis. *Vaccine* 28: 5109-5113.
54. Salemi, S., A. Picchianti-Diamanti, V. Germano, I. Donatelli, A. Di Martino, M. Facchini, R. Nisini, R. Biselli, C. Ferlito, E. Podesta, A. Cappella, F. Milanetti, F. Rossi, R. Amodeo, F. Tabacco, R. Di Rosa, B. Lagana, and D. A. R. 2010. Influenza vaccine administration in rheumatoid arthritis patients under treatment with TNFalpha blockers: safety and immunogenicity. *Clin Immunol* 134: 113-120.
55. Singh, V., S. Jain, U. Gowthaman, P. Parihar, P. Gupta, U. D. Gupta, and J. N. Agrewala. 2011. Co-administration of IL-1+IL-6+TNF-alpha with Mycobacterium tuberculosis infected macrophages vaccine induces better protective T cell memory than BCG. *PLoS One* 6: e16097.

Specificity	Clone	Isotype	Supplier
HLA-DR	L243	IgG2a	BD Biosciences
Human CD1a	O10	IgG1	Dako
NHP CD3	SP34-2	IgG1	BD Biosciences
NHP CD8	RPA-T8	IgG1	BD Biosciences
Human CD11b	M1/70	Rat IgG2b	BD Biosciences
Human CD11c	S-HCL-3	IgG2a	BD Biosciences
Human CD14	M5E2	IgG2a	BD Biosciences
NHP CD20	L27	IgG1	BD Biosciences
NHP CD45	DO58-1283	IgG1	BD Biosciences
Human CD66abce	TET2	IgG2b	Miltenyi Biotec
Human CD80	L307.4	IgG1	BD Biosciences
Human CD83	HB15e	IgG2b	BD Biosciences
Human CD86	FUN-1	IgG1	BD Biosciences
Human CCR7	150503	IgG1	R&D Systems
Human CD123	7G3	IgG2a	BD Biosciences
Human CD163	GHI/61	IgG1	BD Biosciences
Human CD207	2G3	IgG1	BIIR
Human CD209	DCN46	IgG2b	BD Biosciences
Human FcεRIα	CRA1	IgG2b	Miltenyi Biotec
Human cytokeratin 14, 15, 16 and 19	KA4	IgG1	BD Biosciences

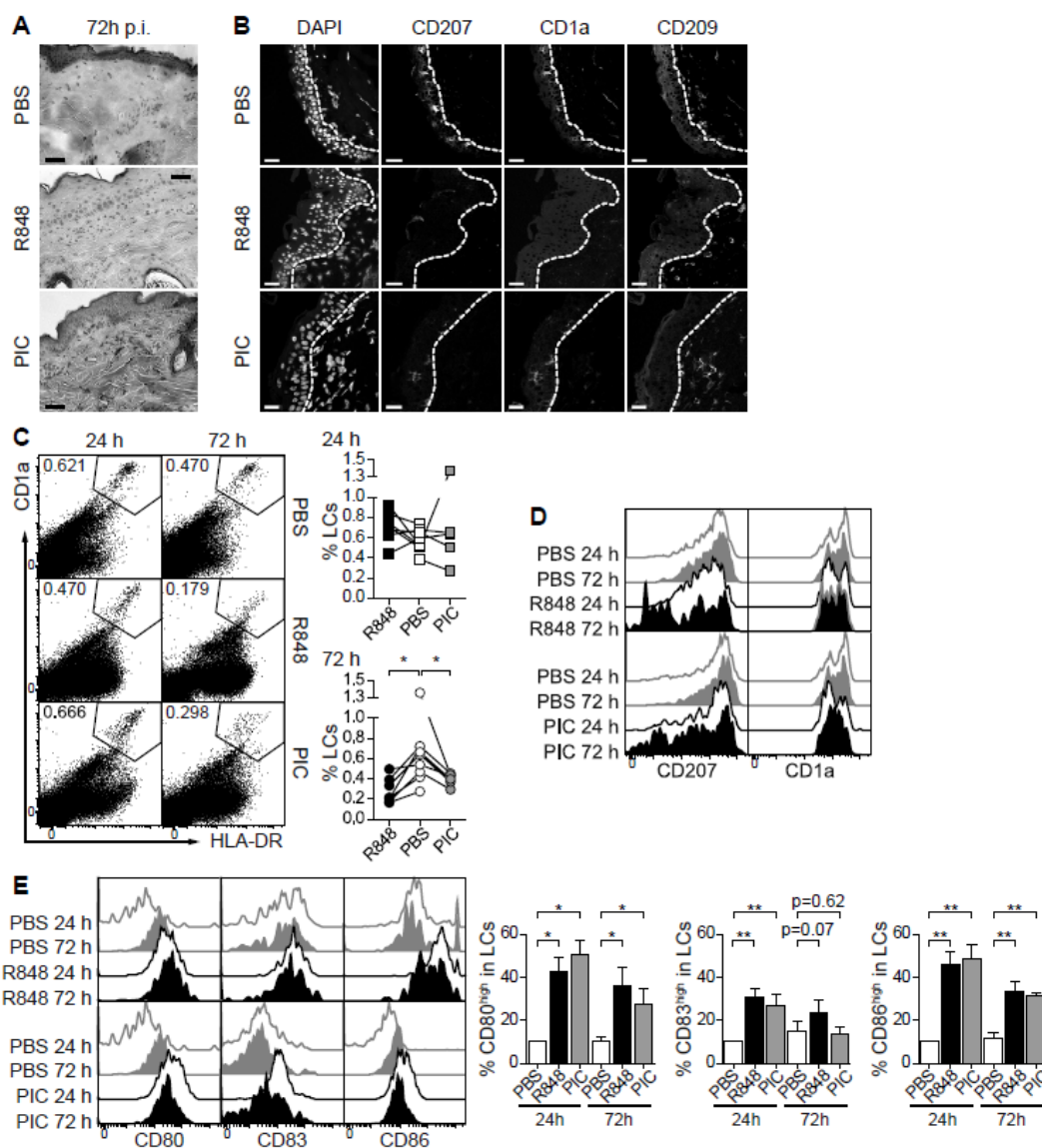
**Table 1: Details of Abs used for flow cytometry.**



**Figure 1: Identification of DCs, macrophages and neutrophils in NHP skin at steady state.** (A) Skin sections, perpendicular to the surface (upper image), were stained with DAPI (blue), anti-CD207 (red) and anti-CD209 (green) mAbs. Epidermis sections, parallel to the skin surface (lower image), were stained with DAPI (blue) and anti-CD1a (red) mAb. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ . (B) Suspensions of cells from epidermis were analyzed by flow cytometry. LCs (HLA-DR<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup>) accounted for 0.71% $\pm$ 0.23% of the living cells and their expression of CD207, CD11b, CD11c, CD14, CD163 and CD209 was analyzed. Most of the HLA-DR<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> cells were keratinocytes (cytokeratin<sup>+</sup>). Isotype-matched staining overlays are shown in solid gray curves. (C) Suspensions of cells from the dermis were analyzed by flow cytometry. PMNs were identified as CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD66<sup>+</sup> cells. Macrophages were identified as CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>low</sup>, CD163<sup>+</sup> cells. Dermal DCs were identified as CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> cells, and included CD14<sup>+</sup> DCs (2.20% $\pm$ 1.45% of dermis cells) and CD1a<sup>+</sup> DCs (0.60% $\pm$ 0.39% of dermis cells). At steady state, PMNs and macrophages accounted for 0.88% $\pm$ 0.45% and 1.48% $\pm$ 0.70% of dermis cells, respectively.

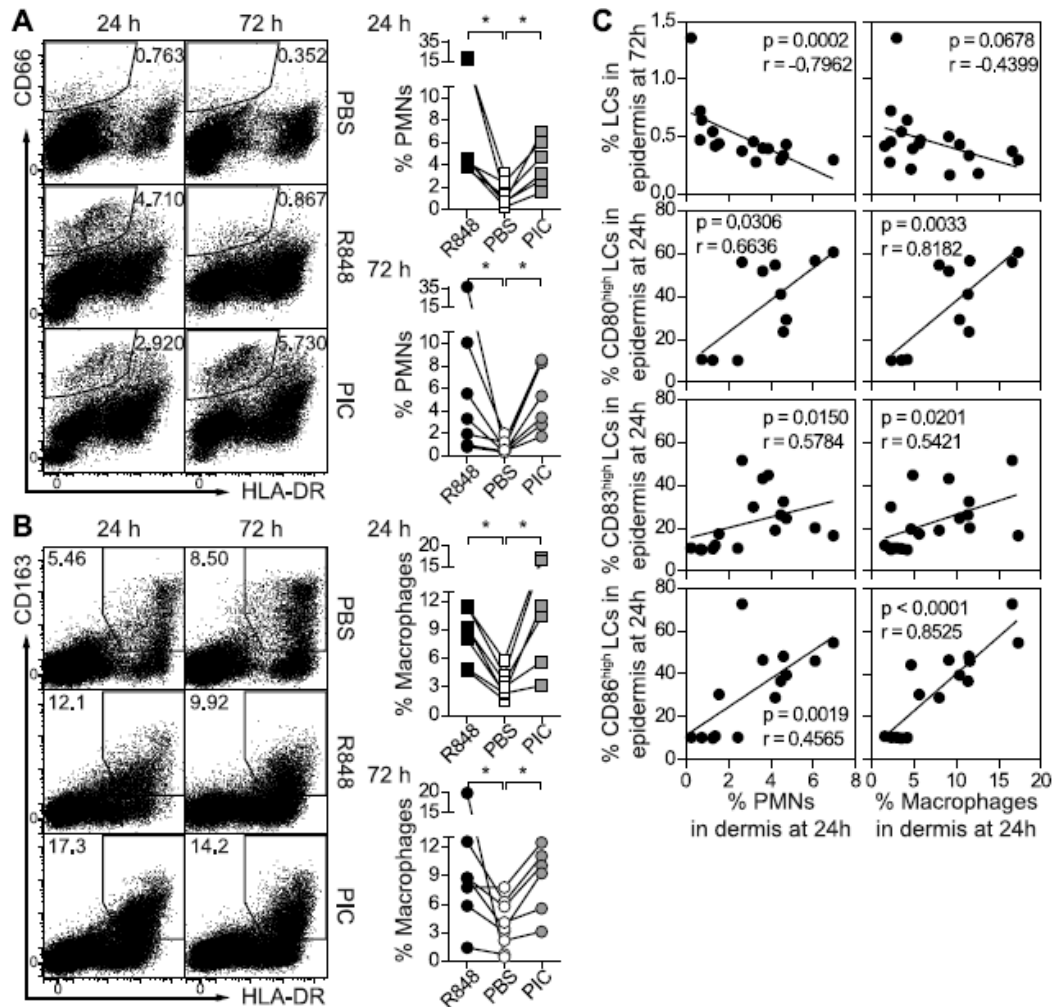


**Figure 2: Immunogenicity of Antigen targeting to LC-specific receptor CD207.** (A) The targeting of Langerhans cells by the anti-CD207-Gag conjugate (Lang-Gag) was compared to the isotype control conjugate (IgG4-Gag) and Gag alone (Gag). Fluorescent labeled proteins (red) were injected i.d together with anti-HLA-DR mAb (green). Injection sites were surgically removed 2 hours after in vivo injection to analyse the fluorescence signals, in the dermis and the epidermis, with a confocallaser scanning microscope system. Scale bars represent 20µm. (B) Gag-specific Abs were titrated in sera from NHPs immunized with anti-CD207-Gag conjugate (Lang-Gag), Gag alone (Gag) or isotype control conjugate (IgG4-Gag). (C) The area under the curves from weeks 0 to 18 (AUC wk 0 to 18) of Gag-specific Ab responses were compared for NHP groups receiving Gag protein alone (Gag), IgG4 isotype control-Gag conjugate (IgG4-Gag), anti-CD207-Gag conjugate (Lang-Gag) or anti-CD207-Gag conjugate mixed with poly(I:C) (Lang-Gag) or anti-CD207-Gag conjugate mixed with poly(I:C) (Lang-Gag+PIC). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . (D) Hemagglutination inhibition (HAI) was measured in the serum of NHPs primed with influenza A/PR/8/34 virus and boosted with the anti-CD207-HAconjugate plus poly(I:C) (Lang-HA+PIC) or with Vaxigrip®. Data are represented as the means  $\pm$  SEM of groups of 3 to 6 animals. Vertical dotted lines indicate the injections (B,D).



**Figure 3: LC responses to the i.d injection of TLR-Ls.** (A) PBS, R848 or poly(I:C) was injected i.d into NHPs and a skin biopsy was carried out 72 h later. Skin sections were stained with hematoxylin-eosin. Scale bars represent 50  $\mu$ m. (B) Skin sites were biopsied 72h after PBS, R848 or poly(I:C) injection and frozen sections were stained with DAPI, anti-CD207, -CD1a and -CD209 mAbs. Dotted lines indicate the frontiers between the epidermis (left) and dermis (right). Scale bars represent 20  $\mu$ m. (C) Cells were extracted from the epidermis and LCs were identified on the basis of HLA-DR and CD1a expression. Skin biopsies from sites injected with R848 or poly(I:C) were compared with autologous sites injected with PBS. (D) The expression of CD207 and CD1a at the cell surface was analyzed in HLA-DR<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> epidermis cells at 24 h and 72 h post injection and the results obtained were compared between injection sites treated with PBS, R848 or poly(I:C). One representative experiment of 8 for PBS, 7 for R848 and 5 for poly(I:C) is shown. (E) The activation/maturation of LCs

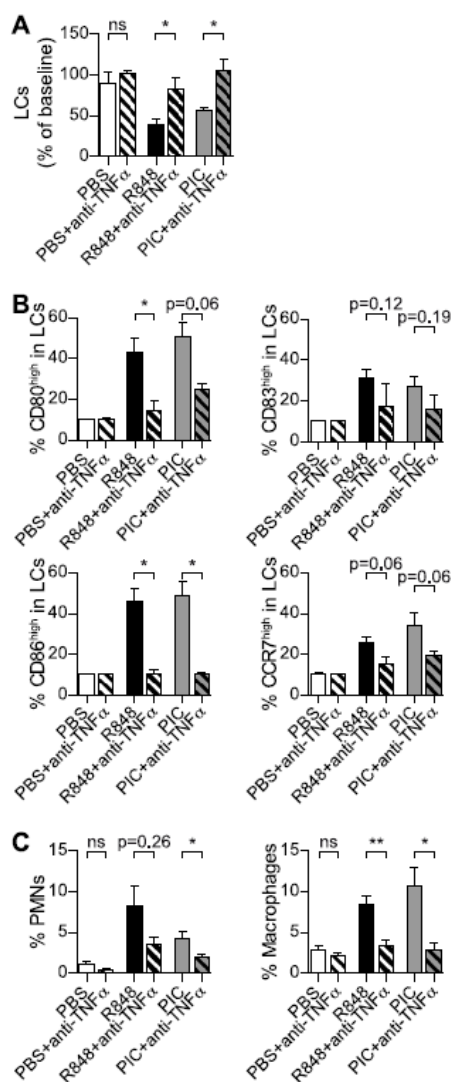
(HLA-DR<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup>) in the epidermis was determined by assessing the expression levels of CD80, CD83, and CD86 surface markers 24 h and 72 h after TLR-L injection. The relative expression of the activation/maturation markers after TLR agonist injection were compared with those after PBS injection. Data are expressed as the means  $\pm$  SD of groups of 4 to 8 animals. PIC, poly(I:C); \* ,  $p < 0.05$ ; \*\* ,  $p < 0.01$ .



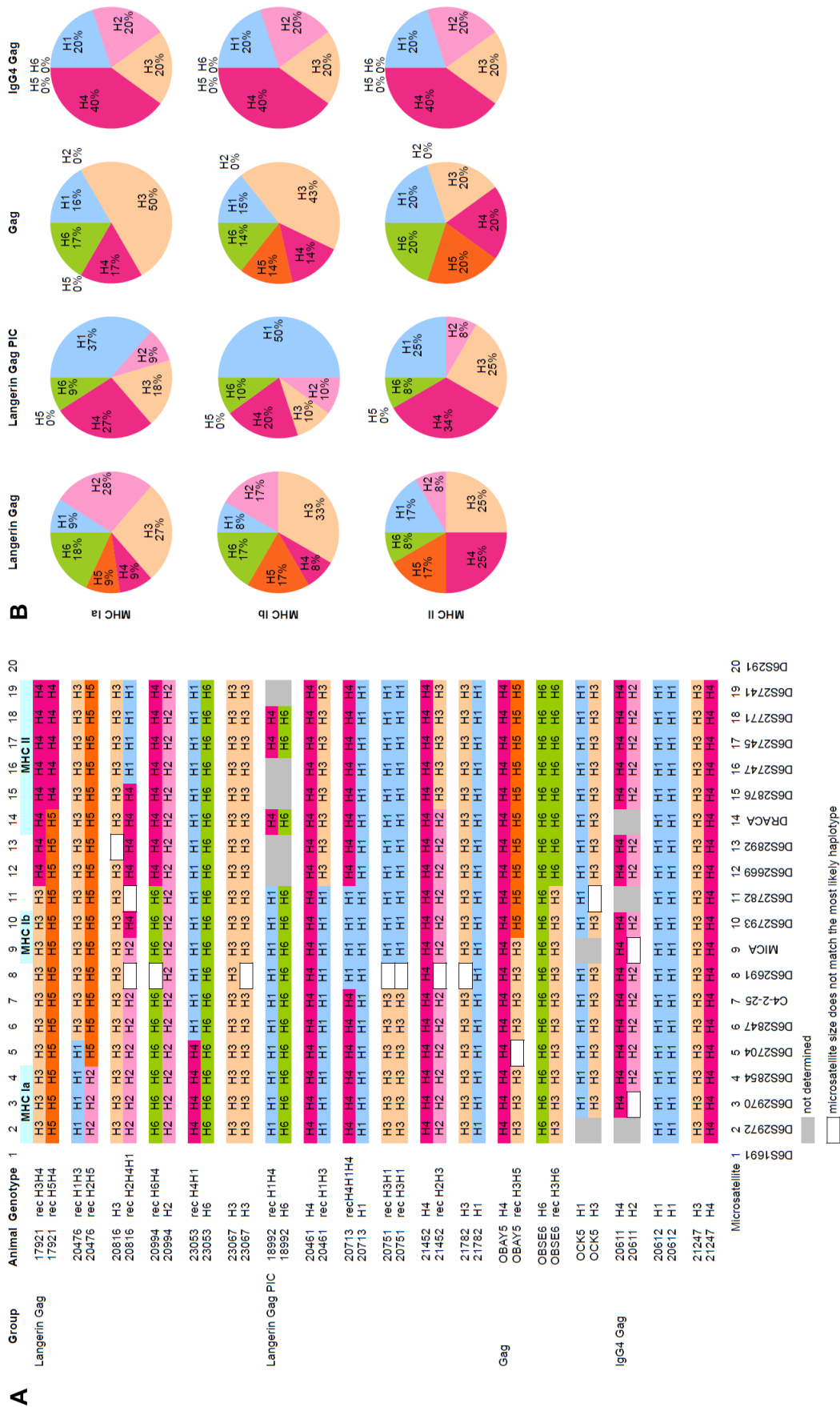
**Figure 4: Modification of the dermal density of PMNs and macrophages induced by i.d. injection of TLR-Ls.** (A) The frequency of PMNs (HLA-DR<sup>-</sup> CD66<sup>+</sup>) in dermal cell suspensions was analyzed for skin biopsy specimens collected 24 h and 72 h after i.d. injection of PBS, R848 or poly(I:C). Biopsy specimens of R848- or poly(I:C)-injected skin were compared with autologous specimens of PBS-injected skin. (B) The frequency of macrophages (HLA-DR<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup>) in dermal cell suspensions was analyzed. Biopsy specimens of R848- or poly(I:C)-injected skin were compared with autologous specimens of PBS-injected skin. (C) the density of LCs in the epidermis 72 h after injection was plotted (upper panels) as a function of PMN (left column) or macrophage (right column) dermal frequency at 24 h. Similar plots were generated for the relative expression level of activation/maturation molecules on LCs 24 h after injection PIC, poly(I:C); \*,  $p < 0.05$ .

174

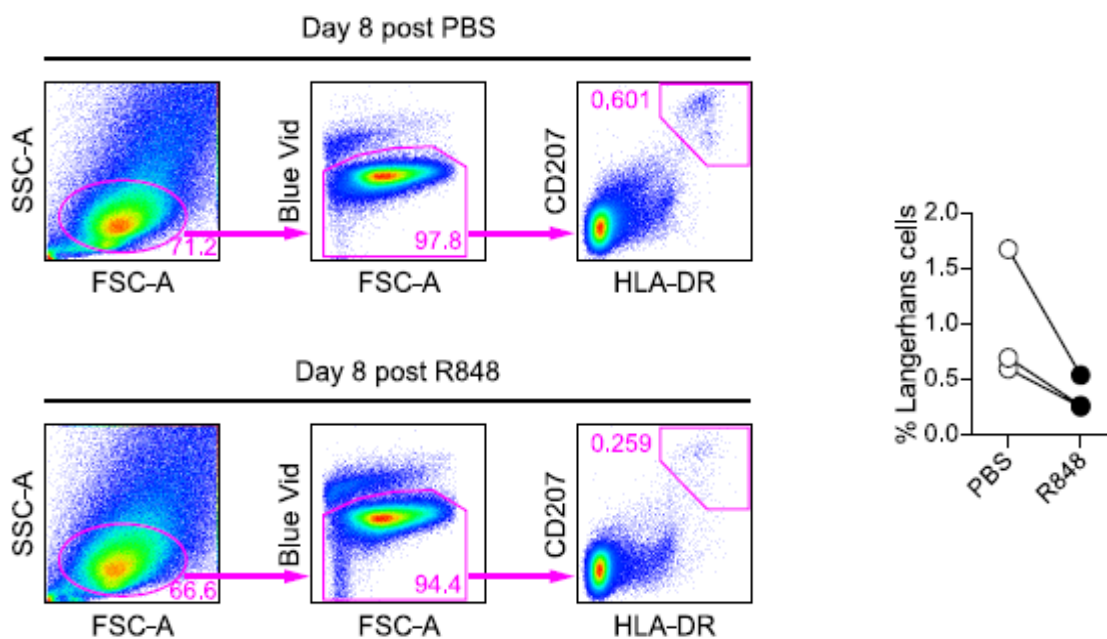




**Figure 6: Involvement of TNF- $\alpha$  in the TLR-L-mediated activation of LCs and inflammation in vivo.** (A) NHPs received i.d. injections of PBS, R848 or poly(I:C) with or without etanercept (anti-TNF- $\alpha$ ). Skin biopsies were carried out 72 h later. Cells were extracted from the epidermis and LCs were identified by labeling with HLA-DR and CD1a mAbs. The frequencies of LCs are expressed as a percentage of the baseline value (steady state). (B) The relative expression of CD80, CD83, CD86 and CCR7 was analyzed on LCs extracted from biopsy specimens collected 24h after i.d. injection, as indicated. (C) The frequency of PMNs (HLA-DR<sup>-</sup> CD66<sup>+</sup>) and macrophages (HLA-DR<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup>) in dermal cell suspensions was determined from skin biopsy specimens collected 24 h after i.d injection of PBS, R848 or poly(I:C), with or without etanercept (anti-TNF- $\alpha$ ), as indicated. Results are expressed as the means  $\pm$ SEM of groups of 3 to 6 animals. Ns, non significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .



**Figure S1: MHC haplotypes of the Mauritian cynomolgus macaques included in the study.** (A) MHC genotypes were determined by microsatellite analysis as described by Aarnink et al. 2011. Immunogenetics 63:267-274. White boxes indicate variant microsatellite allele sizes relative to the expected haplotype. These rare variants generally differ by the addition or loss of a single repeat unit. (B) Frequency of each MHC class I and II haplotype in vaccinated animal groups.



**Figure S2: Density in the epidermis 8 days after the i.d. injection of PBS or R848.**

Suspensions of cells from the epidermis of biopsy specimens collected 8 days after the i.d. injection of PBS (100µl) or R848 (200 µg in 100 µl) was analyzed by flow cytometry. The frequency of LCs (HLA-DR<sup>+</sup> CD207<sup>+</sup>) is expressed as a percentage of living cells.

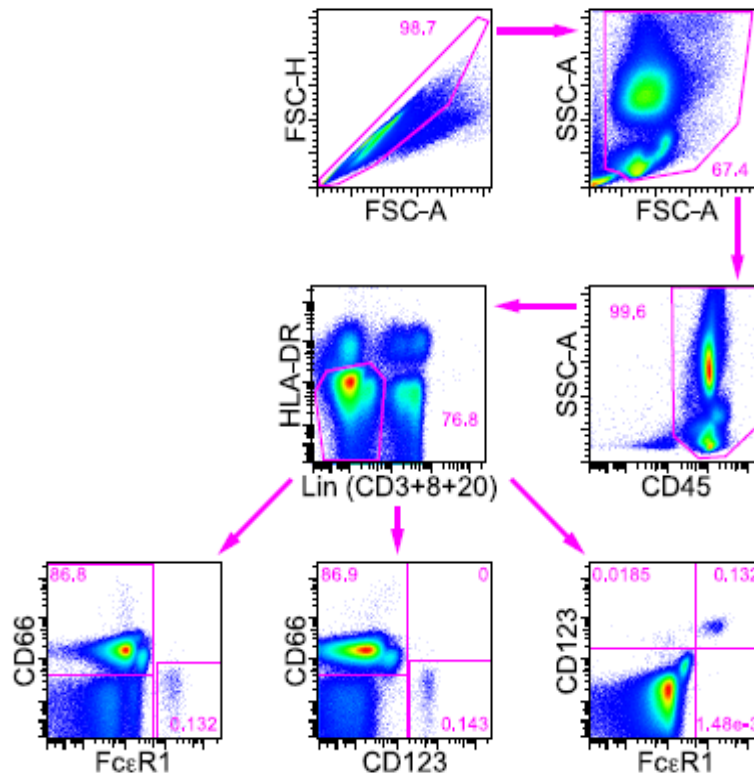


Figure S3: Characterization of HLA-DR<sup>-</sup> CD66<sup>+</sup> cells in NHPs. Flow cytométrie analysis of the expression of FcεR1a and CD123 by HLA-DR<sup>-</sup> CD66<sup>+</sup> cells from whole blood.

## **Résultats complémentaires**

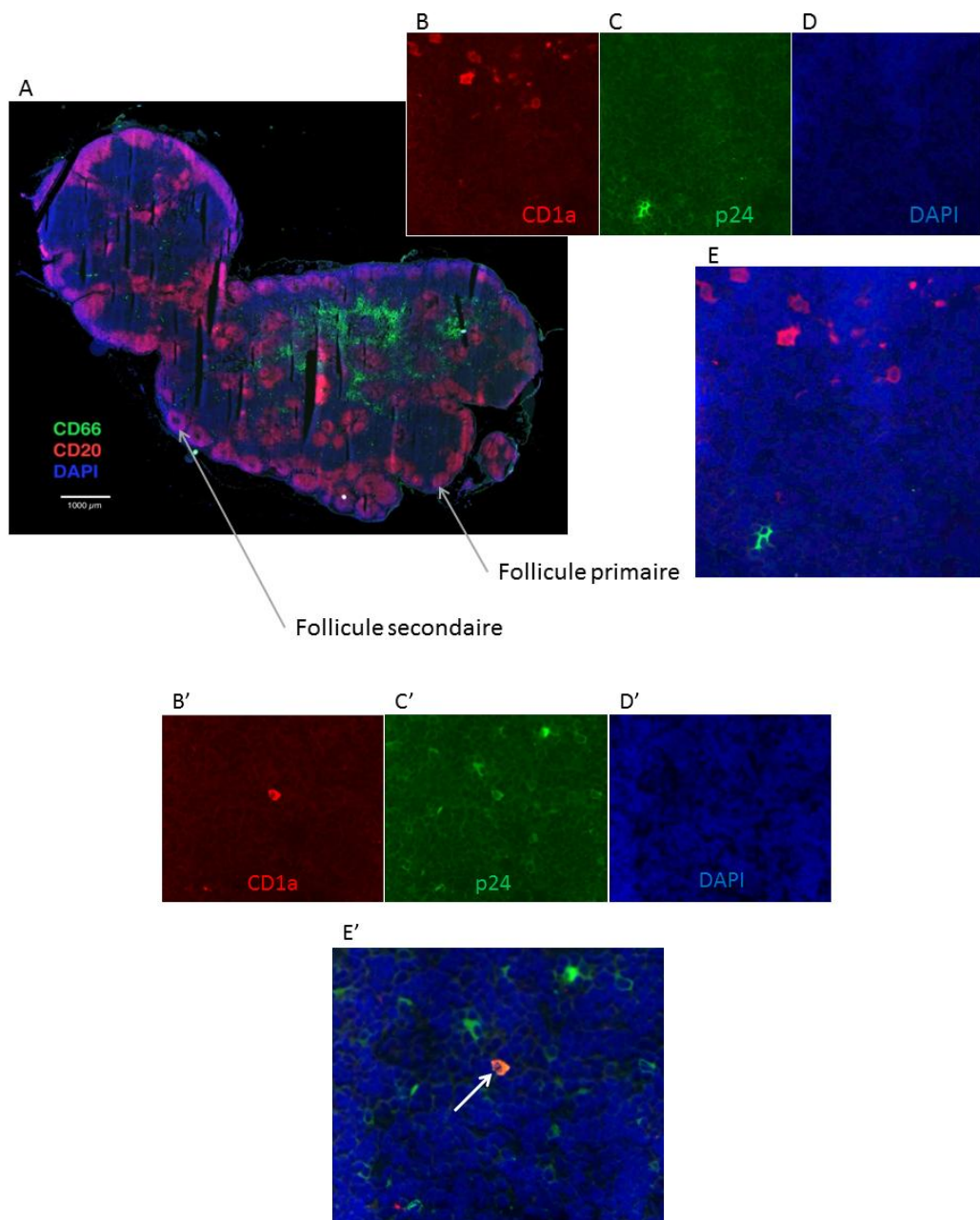
Les travaux réalisés au sein du laboratoire avant mon arrivée, ont montré que suite à une vaccination par le plasmide auxoGTUmultiHIV<sub>B</sub> associée à une EP locale, l'antigène vaccinal est synthétisé en grande quantité dans la peau et plus principalement dans l'épiderme, où résident les cellules de Langerhans (Martinon et al., 2009). Ces cellules semblent se charger d'antigène au cours du temps. Par la suite, nous avons montré que le nombre de LC augmentait et que celles-ci s'activaient 24h post vaccination, c'est à dire au pic de la synthèse de l'antigène vaccinal dans la peau. Entre 24 et 72h, le nombre de LC diminue, illustrant leur migration probablement vers les nœuds lymphatiques drainant le site d'injection (article 3).

Nous avons donc cherché à détecter la présence d'antigène vaccinal dans les nœuds lymphatiques suite à la vaccination et de mettre en évidence son éventuelle association avec une ou des populations d'APC. Pour ces expériences, nous avons utilisé le plasmide auxoGTUmultiHIV<sub>B</sub> car nous possédons un Ac anti-p24 performant pour détecter l'Ag produit par l'ADN vaccinal par immunohistofluorescence (Martinon et al., 2009). Nous avons donc immunisé des animaux avec le plasmide auxoGTUmultiHIV<sub>B</sub> par voie i.d en association à une EP locale au niveau du site d'injection à environ 3-4 cm d'une chaîne de nœuds lymphatiques drainant le site d'injection. Nous avons ensuite prélevé les nœuds lymphatiques 3 et 8 jours post vaccination pour une étude d'immunohistofluorescence.

Les nœuds lymphatiques drainant le site d'injection présentent un nombre important de zones B en forme de follicules. Le marquage par un anticorps anti-CD20, marqueur spécifique des lymphocytes B, en rouge permet de localiser ces différentes zones. Des follicules primaires et secondaires peuvent être observés (Figure 12A). Les follicules secondaires témoignent de la présence de centres germinatifs et suggèrent la prolifération de lymphocytes B spécifiques. Nous pouvons également observer les granulocytes présents dans le NL que nous avons mis en évidence par cytométrie (article 2). La localisation de ces granulocytes est très restreinte et correspond probablement à des zones irriguées par les vaisseaux sanguins.

Huit jours post vaccination, nous avons détecté la présence de cellules positives pour l'Ag p24. Comme il semble que les LC se chargent d'Ag vaccinal dans l'épiderme (Martinon et al., 2009), nous avons vérifié si l'Ag pouvait être exprimé par des cellules CD1a+ dans les NL. À première vue, l'antigène p24 n'est pas localisé de façon préférentielle dans les zones où se trouvent

majoritairement les cellules CD1a<sup>+</sup> (Figure 12 B, C, D, E). Cependant nous avons trouvé des évènements de co-marquage entre des cellules CD1a exprimant la p24 (Figure 12 B', C', D', E').



**Figure 12: coupe de nœud lymphatique 8 jours post vaccination.**

Coupe de 6μm de nœud lymphatique inguinal prélevé 8 jours après injection i.d du vaccin auxoGTUmultiHIVb associé à une EP à environ 3-4 cm de la chaîne ganglionnaire. Les zones B sont visualisées en rouge par un Ac anti-CD20, les granulocytes sont détectés par un Ac anti-CD66 et les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI en bleu (A). Les cellules CD1a<sup>+</sup> sont détectées en rouge (B, B'), l'Ag p24 est détecté en vert (C, C') et les noyaux en Bleu (D, D'). La superposition du marquage CD1a, p24 et DAPI est illustrée en (E, E'). Les figures B, C, D, E et B',C',D', E' proviennent de zones paracorticales. Les flèches indiquent la présence de co-marquages. Le logiciel photoshop CS4 a été utilisé afin d'obtenir les superpositions d'images.

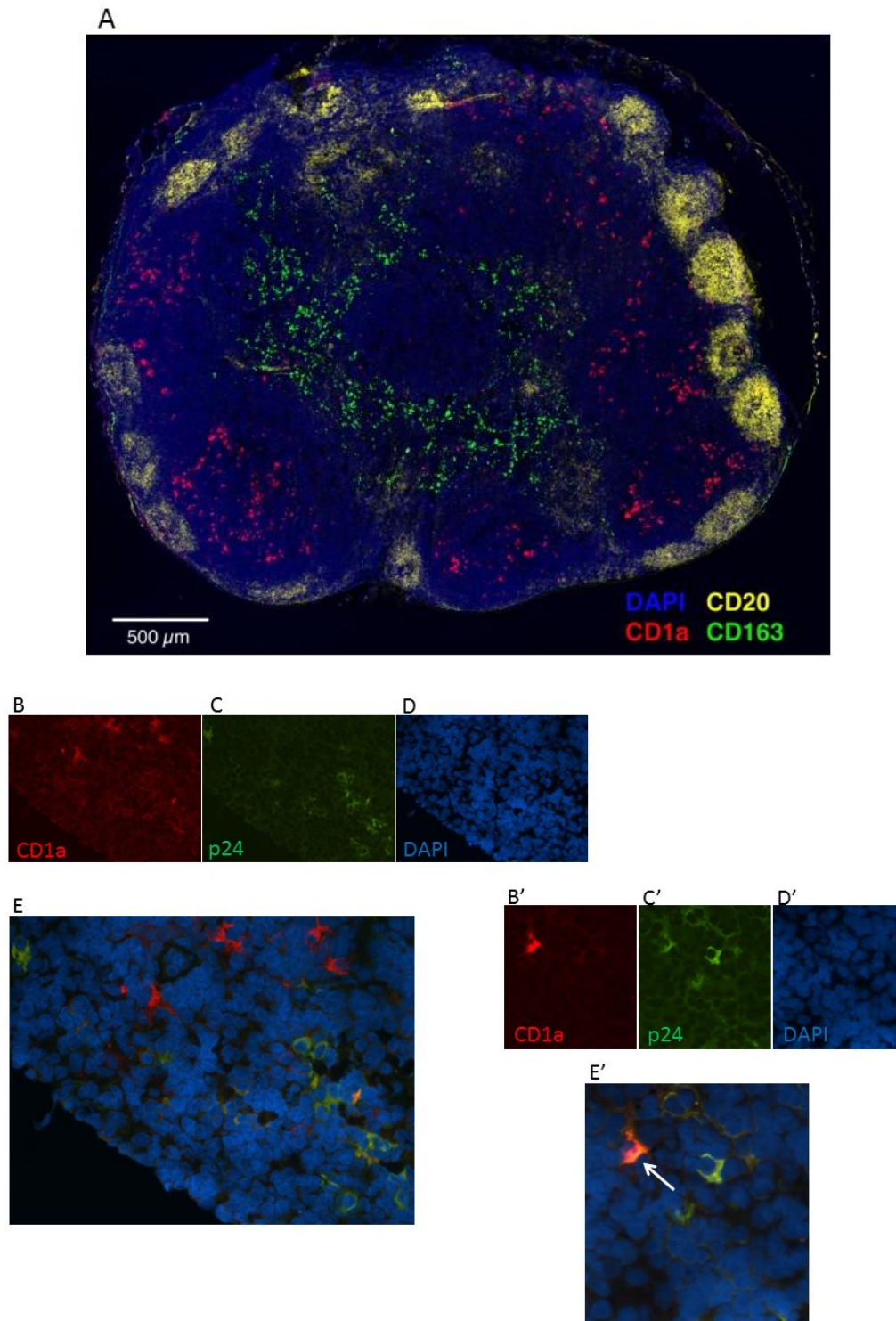
Vingt-neuf jours post vaccination, les zones B semblent moins nombreuses que huit jours post vaccination (Figure 13A). Les cellules CD1a<sup>+</sup> se trouvent dans des zones non B correspondant vraisemblablement au paracortex alors que les cellules CD163<sup>+</sup> se localisent plutôt au niveau de la médulla (Figure 13A).

À cette date, nous avons de nouveau identifié des cellules positives pour l'antigène p24, bien que ces événements soient rares. Cette fois encore nous avons constaté que l'antigène ne se localisait majoritairement pas dans les zones riches en cellules CD1a<sup>+</sup> (Figure 13B, C, D, E). Cependant quelques cellules exprimant le CD1a et l'antigène p24 ont été mises en évidence (Figure 13B', C', D', E').

Bien que la présence des cellules p24 soit relativement rare, que ce soit trois ou huit jours post vaccination, ces résultats confirment le transport de l'antigène vaccinal de la peau jusque dans les NL. Cependant, ils ne permettent pas de préciser si l'Ag a été pris en charge au niveau de la peau puis transporté par des cellules dans les NL ou s'il est arrivé dans les NL par drainage passif via les canaux lymphatiques avant d'être pris en charge par les cellules résidentes du NL.

Les cellules CD1a<sup>+</sup> dans les NL peuvent correspondre à des LC ou à des DDC CD1a<sup>+</sup> après leur migration de la peau vers les NL. La présence de cellules p24<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> suggère que des cellules CD1a<sup>+</sup> de la peau ont pris en charge l'Ag avant de migrer dans les NL pour le présenter aux cellules T.





**Figure 13: coupe de nœud lymphatique 29 jours post vaccination.**

Coupe de 6 $\mu$ m de NL inguinal prélevé 29 jours après injection i.d du vaccin auxoGTUmultiHIVb associé à une EP à environ 3-4 cm de la chaîne ganglionnaire. Les zones B sont visualisées en jaunes par un Ac anti-CD20, les macrophages sont détectés par un Ac anti-CD163 et les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI en bleu (A). À partir du même NL, les cellules CD1a+ sont détectées en rouge (B, B'), l'Ag p24 est détecté en vert (C, C') et les noyaux en bleu (D, D'). La superposition du marquage CD1a, p24 et DAPI est illustrée en (E, E'). Les figures B, C, D, E et B', C', D', E' proviennent de zones paracorticales. Les flèches indiquent la présence de co-marquages. Le logiciel photoshop CS4 a été utilisé afin d'obtenir les superpositions d'images.

## DISCUSSION

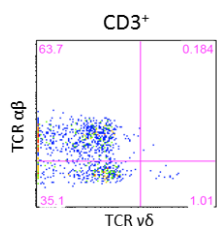
Les mécanismes responsables de la mise en place d'une réponse immunitaire puissante, persistante et protectrice sont encore aujourd'hui largement méconnus. La connaissance de ces mécanismes est déterminante non seulement pour la mise au point de vaccins contre des maladies infectieuses émergentes mais aussi pour le suivi et l'amélioration des vaccins existants. De nombreux arguments tendent à montrer que les événements précoces induits suite à l'injection d'un immunostimulant déterminent l'orientation, la nature et l'intensité de la réponse immune.

Au travers de ces travaux expérimentaux, nous nous sommes intéressés à la réponse immunitaire précocement induite au niveau du site d'injection suite à l'administration par voie intradermique du vaccin ADN auxo-GTU en association à une électroporation (EP) locale. Nous avons exploré également le ciblage des antigènes vaccinaux sur les cellules dendritiques (DC) de la peau et les mécanismes permettant une modulation de la réponse par des adjuvants ligands de TLR.

### I- Caractérisation des cellules immunitaires cutanées chez le macaque cynomolgus et similarités avec les populations cutanées humaines

Nous avons commencé nos études expérimentales par la caractérisation fine des populations de cellules immunitaires peuplant la peau du macaque cynomolgus à l'état normal. En effet bien que les cellules immunitaires de la peau aient été particulièrement bien caractérisées chez la souris et chez l'homme, peu d'études se sont penchées sur les populations cutanées chez le macaque (Romain et al., 2012). Cette caractérisation est pourtant indispensable afin de mettre en évidence les événements cellulaires ayant lieu localement dans un contexte inflammatoire.

Les lymphocytes de l'épiderme et du derme constituent la population de cellules du système immunitaire la plus représentée dans la peau ce qui semble être très similaire à l'homme. Comme chez l'homme (Clark et al., 2006; Foster et al., 1990), nous avons démontré que ces lymphocytes présentaient en grande majorité un TCR de type  $\alpha/\beta$  (Figure 14) au contraire de ce qui est observé dans la peau des souris où la grande majorité des lymphocytes expriment un TCR de type  $\gamma/\delta$  (Chodaczek et al., 2012).



**Figure 14: TCR des cellules CD3<sup>+</sup> de la peau**

Expression des TCR de type  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  par les lymphocytes de l'épiderme chez le macaque cynomolgus. Image représentative d'un animal (n=4)

Dans l'épiderme nous avons caractérisé les LC qui expriment, comme chez l'homme, fortement le CD1a, HLA-DR et le CD207 et expriment le CD11c. Cependant, contrairement à l'homme ces cellules n'expriment pas le CD1c (Furio et al., 2010; Klechevsky et al., 2008).

Dans le derme nous avons caractérisé les DDC CD1a<sup>+</sup>. Ces cellules sont CD11c<sup>+</sup> CD1c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> et correspondent très probablement aux DDC CD1a<sup>+</sup> humaines (Furio et al., 2010; Klechevsky et al., 2008; Nestle et al., 1993; Lenz et al., 1993). Cependant, cette population exprime le CD207 alors que les DDC CD1a<sup>+</sup> humaines sont négatives pour ce marqueur, qui, chez l'homme, est exprimé uniquement par les LC (Klechevsky et al., 2008). Nous avons également mis en évidence une population de cellules CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> pouvant correspondre au DDC CD14<sup>+</sup> humaines (Klechevsky et al., 2008; Nestle et al., 1993; Lenz et al., 1993). Les DDC CD14<sup>+</sup> ont été décrites comme les DC les moins matures de la peau humaine (Angel et al., 2007) ce qui est en accord avec la faible expression de HLA-DR par les DDC CD14<sup>+</sup> chez le macaque.

Les macrophages simiens résidant dans le derme, expriment fortement HLA-DR, et le CD163. Ces cellules sont également positives pour le CD11b et le CD14. Ce qui est en accord avec la littérature humaine (Ochoa et al., 2008; Angel et al., 2007; Zaba et al., 2007).

Ces résultats démontrent que malgré quelques différences phénotypiques observées entre les populations cutanées humaines et simiennes, les cellules du système immunitaire du macaque cynomolgus montrent d'importantes similarités avec l'homme. Chaque population décrite chez l'homme trouve une population correspondante chez le macaque. Enfin, les déterminants des cellules de macaque présentent une forte réactivité croisée avec ceux des cellules humaines, permettant dans une majorité de cas d'utiliser les mêmes outils d'indentification ou de bio-analyse (anticorps monoclonaux par exemple) et de tester directement chez l'animal le vaccin développé pour l'homme, sans nécessité d'adaptation préalable. Le choix du macaque cynomolgus comme modèle d'étude de la réponse vaccinale paraît donc pertinent pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les réponses vaccinales et améliorer les stratégies de vaccination chez l'homme.

## II- Etude de la dynamique de la réponse immunitaire locale induite par le vaccin auxoGTU administré par voie intradermique en association à une électroporation (EP) locale.

### 1. Évènements cellulaires et moléculaires au niveau du site de vaccination

La vaccination par le vaccin ADN auxo-GTU en association à une EP locale, induit un recrutement rapide de cellules qualifiées d'inflammatoires, puisque très faiblement représentées ou absentes à l'état normal, dans le derme et dans l'épiderme. Parmi ces cellules inflammatoires nous avons identifié des granulocytes, des macrophages inflammatoires et des cellules monocytaires recrutées majoritairement 24h après vaccination. Nous avons également mis en évidence un recrutement plus tardif de DC inflammatoires localisées dans l'épiderme. Les DC et les macrophages inflammatoires dérivent de précurseurs monocytaires sanguins (Hespel and Moser, 2012; Iijima et al., 2011). La présence dans les tissus de cellules arborant un phénotype proche des monocytes entre 24h et 72h suggère un recrutement continu de monocytes sanguins qui ne se sont pas encore différenciés (Tamoutounour et al., 2013).

Dans notre étude, nous pouvons faire la distinction entre DC résidentes et DC inflammatoires au niveau de l'épiderme et entre macrophages résidents et macrophages inflammatoires au niveau du derme. Cette distinction est importante car ces populations de DC/Macrophages résidentes et inflammatoires ne semblent pas avoir les mêmes fonctions (Hespel and Moser, 2012). Comme le montrent de nombreuses études, les DC résidentes sont directement impliquées dans l'induction de la réponse immunitaire. En effet, elles ont la capacité de capturer l'Ag (Ouchi et al., 2011), de migrer (Ohl et al., 2004; Villablanca and Mora, 2008), de présenter l'Ag et d'orienter la réponse vers l'induction d'une immunité (Gao et al., 2013; Haniffa et al., 2012) ou au contraire d'une tolérance (Seneschal et al., 2012; Shklovskaya et al., 2011; Chu et al., 2012). Le rôle des DC inflammatoires apparaît moins clair. Certaines études ont démontré que les DC inflammatoires sont également impliquées dans l'induction et l'amplification de la réponse adaptative (Hespel and Moser, 2012). En effet les DC inflammatoires peuvent capturer et transporter l'Ag dans les LN (Hohl et al., 2009; Cheong et al., 2010), ainsi que présenter l'Ag et activer des lymphocytes naïfs (Cheong et al., 2010; Hohl et al., 2009). Mais d'autres études suggèrent leur importance au niveau du site inflammatoire pour lutter directement contre les infections (Serbina et al., 2003; Iijima et al., 2011). Il existe différentes catégories de DC inflammatoires comme les « *TNF iNOS producing DC* » (TIP DC) les SLAN DC ou encore les IDEC (Haniffa et al., 2013). Les TIP DC ont la capacité de synthétiser des composés toxiques comme le TNF- $\alpha$  et l'iNOS qui participent directement à l'élimination des pathogènes

(Serbina et al., 2003). Les souris déficientes pour le CCR2 ne montrent pas de recrutement de monocytes en conditions inflammatoires et sont par conséquent déficientes en DC inflammatoires. En cas d'infection cutanée, ces souris ne survivent pas, alors que, les souris sauvages présentant un recrutement de DC inflammatoires survivent à l'infection (Iijima et al., 2011). Cependant, il semble que malgré la capacité de ces DC inflammatoires à activer des lymphocytes T naïfs, ces cellules ne soient pas requises pour l'induction d'une réponse mémoire efficace et protectrice (Iijima et al., 2011). Ces résultats suggèrent l'importance des DC inflammatoires plutôt dans la génération du microenvironnement que dans l'induction d'une réponse immunitaire. Le microenvironnement généré par les cellules inflammatoires génère probablement des signaux de danger impliqués dans l'activation des DC résidentes et donc par voie de conséquence dans l'orientation de la réponse immunitaire. En effet, au cours de notre étude, nous avons également mis en évidence la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire dès 24h post vaccination. Une augmentation des facteurs solubles tel que MCP-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , impliqués dans le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires (Toichi et al., 2008; Gröne, 2002) a été observé, tout comme une augmentation des cytokines IL-18 (Maxwell et al., 2006) et IL-15 (Banchereau et al., 2012; Klebanoff et al., 2004), également impliquées dans l'activation cellulaire et l'orientation de la réponse immunitaire. Les DC sont capables selon le contexte d'induire soit une tolérance soit une immunité vis-à-vis d'un Ag. L'état d'activation de la DC, la génération d'un microenvironnement inflammatoire, la présence d'Ag du non-soi (Seneschal et al., 2012; Ouchi et al., 2011) et la contribution de plusieurs populations de DC dans la présentation de l'Ag (Shklovskaya et al., 2011) sont des éléments déterminant l'orientation de la réponse vers la tolérance ou vers l'immunité.

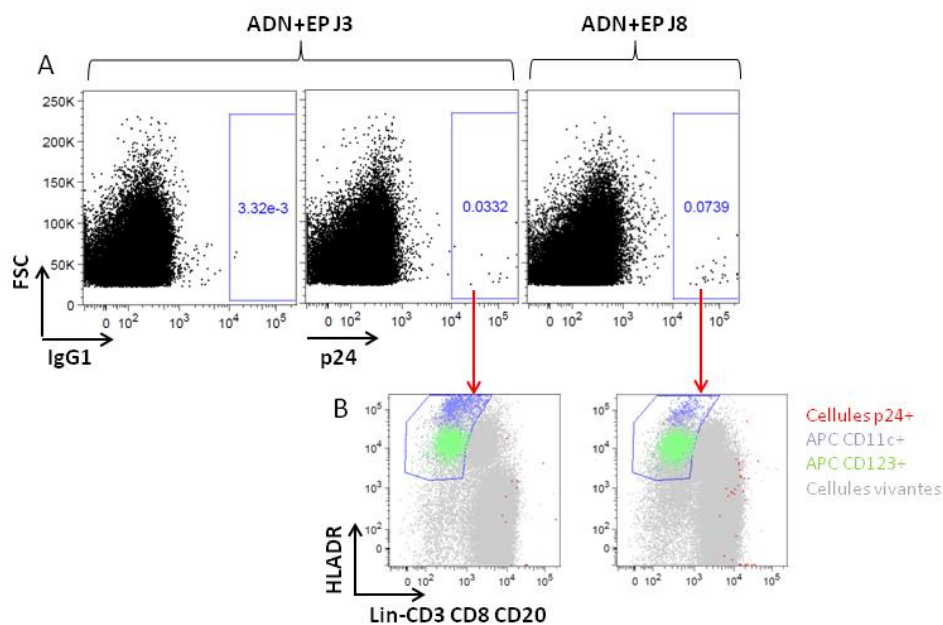
Nous avons mis en évidence un recrutement de DC inflammatoires dans l'épiderme correspondant probablement à des IDEC (Wollenberg and Mommaas, 2002). Les IDEC sont capables d'infiltrer l'épiderme et le derme en condition inflammatoire (Guttman-Yassky et al., 2007) et de produire de l'IL-18 (Novak et al., 2004), cytokine pro-inflammatoire impliquée comme l'IL-12 dans l'induction d'une immunité à médiation cellulaire orientée vers la production de lymphocytes T spécifiques de type Th1 (Maxwell et al., 2006). Ceci paraît intéressant car notre analyse du microenvironnement après vaccination révèle une augmentation significative de l'IL-18 72h post vaccination, c'est-à-dire au pic de recrutement des IDEC. Le vaccin auxo-GTU induit une réponse cellulaire puissante et persistante et une réponse humorale plutôt faible et non persistante (Martinon et al., 2009). Cette production d'IL-18 est donc en accord avec l'orientation de la réponse immunitaire induite par ce vaccin. Bien évidemment nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que la production d'IL-18 est attribuée aux IDEC. En effet, d'autres cellules comme les kératinocytes sont également des sources d'IL-18 (Gröne, 2002). Un marquage intracellulaire de cette cytokine après vaccination

pourrait permettre de répondre à cette question. Néanmoins, ces résultats sont en faveur d'un rôle des IDEC dans la génération du microenvironnement nécessaire à l'induction de la réponse immunitaire.

Les cellules résidentes participent également à la génération du microenvironnement. Les cellules épithéliales et les fibroblastes sont des sources importantes de chimiokines indispensables au recrutement des monocytes dans les tissus en condition inflammatoire (Koch et al., 2006; Gröne, 2002). En effet nos résultats montrent une augmentation significative de MCP-1 (CCL2) après vaccination. Cette chimiokine est largement produite par les kératinocytes mais également par les macrophages. Nos résultats suggèrent également que les APC résidentes sont essentielles dans la génération de chimiokines, indispensables au recrutement de cellules sanguines. En effet MIP-1 $\beta$  (CCL4), une autre chimiokine impliquée dans le recrutement de monocytes et dans l'activation des granulocytes, est majoritairement produite par les macrophages résidents, bien que les cellules monocytaires et les macrophages inflammatoires en produisent également. Aucune autre population n'a été trouvée positive pour cette chimiokine confirmant que dans nos conditions expérimentales seules les populations de monocytes/macrophages synthétisent MIP-1 $\beta$ .

Nous n'avons pas mis en évidence de changement, dans les populations d'APC résidentes du derme, qui aurait suggéré une implication de ces cellules dans le processus vaccinal. Cependant des études *in vitro* montrent la capacité des DDC humaines à activer des lymphocytes T naïfs (Klechevsky et al., 2008; Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993). Les DDC CD14<sup>+</sup> semblent d'ailleurs impliquées dans la génération de cellules T CD4<sup>+</sup> folliculaires auxiliaires, nécessaire au soutien de la réponse humorale (Klechevsky et al., 2008). D'autres études chez la souris montrent l'implication de certaines populations de DDC dans l'orientation de la réponse vers un profil Th2 (Murakami et al., 2013; Gao et al., 2013; Dijkstra et al., 2008). Dans nos conditions expérimentales, il est fort probable que le faible nombre de DDC obtenu ne nous permette pas de mettre en évidence une claire variation de la quantité de DDC après vaccination. Ce point est donc une limite importante de notre approche, en partie due à la faible quantité de peau disponible par condition testée. Néanmoins, dans l'épiderme, nous avons observé une modification au cours du temps de la population de LC. Nous avons constaté une augmentation transitoire des LC dans les temps précoces suite au traitement de la peau. Parallèlement à cette augmentation, nous avons observé l'activation d'une sous population de LC, illustrée par une nette augmentation de l'expression du CD86, du CD83 et de l'HLA-DR. Par la suite nous avons constaté une diminution de ces cellules et un retour à un niveau d'activation des LC restantes proche du niveau basal. Ces résultats suggèrent un départ des LC activées vers les nœuds lymphatiques (Ohl et al., 2004). Ces résultats, ainsi que ceux montrant que les LC se chargent en Ag dans les couches supérieures de l'épiderme après injection du vaccin auxo-GTU avec EP (Martinon et

al., 2009), nous permettent d'émettre l'hypothèse que les LC sont impliquées dans la prise en charge de l'Ag et son transport dans les nœuds lymphatiques drainant le site d'injection. De plus nos résultats d'immunohistofluorescences, montrant la présence de cellules positives pour le CD1a et l'Ag vaccinal, suggèrent également l'implication des LC dans le transport et la présentation de l'Ag dans les LN. Nous avons démontré que les LC dans l'épiderme n'expriment pas le CD1c au contraire des DDC CD1a<sup>+</sup>. Dans les nœuds lymphatiques, les CD1a<sup>+</sup> peuvent elles aussi être divisées en 2 sous populations en fonction de l'expression du CD1c (manuscrit 2). Ces résultats suggèrent la présence dans le NL de LC CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup> et de DDC CD1a<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>. Nous ne pouvons donc pas affirmer que les cellules CD1a<sup>+</sup>p24<sup>+</sup> dans les NL soient des LC. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression du CD1c par les cellules CD1a<sup>+</sup>p24<sup>+</sup>. La cytométrie de flux nous est apparue comme une méthode plus adaptée pour préciser le phénotype des cellules CD1a<sup>+</sup>p24<sup>+</sup>.



**Figure 15: Cellules p24 positives dans le NL 3 et 8 jours post vaccination.**

Les animaux ont été vaccinés par voie i.d à 3 ou 4 cm des chaînes ganglionnaires avec 200mg d'ADN répartis en 2 injections. Les cellules positives pour l'Ag sont sélectionnées dans l'ensemble des cellules vivantes dans un graphique FSC vs p24 trois et huit jours post vaccination. La fenêtre de positivité a été placée grâce à un isotype contrôle trois jours post vaccination (A). Les cDC HLADR<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> et les pDC HLADR<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> sont indiquées en bleu et vert respectivement sur l'ensemble des cellules vivantes en gris. En rouge sont indiquées les cellules positives pour l'Ag p24.

Nos résultats préliminaires montrent que trois et huit jours post vaccination, nous détectons des cellules positives pour l'Ag p24 dans les NL, bien que ce nombre soit extrêmement faible (Figure 15A). Ces premiers résultats confirment donc les résultats d'immunohistofluorescence montrant la présence de cellules positives pour l'Ag dans les NL (Figure 12, Figure 13). Les DC du NL ont été

isolées selon leur phénotype HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, caractéristique des APC, et superposées sur l'ensemble des cellules vivantes (gris) dans un graphique HLA-DR versus Lineage (CD3-CD8-CD20) avec les cDC CD11c<sup>+</sup> en bleu et les pDC CD123<sup>+</sup> en vert (Figure 15B). La superposition des cellules p24<sup>+</sup> (rouge) sur l'ensemble des cellules vivantes révèle que ces dernières ne sont pas des APC puisqu'elles ne sont pas HLA-DR<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (Figure 15B). Jusqu'à présent, nous n'avons donc pas été en mesure de mettre en évidence des APC co-marquées avec l'Ag vaccinal, et n'avons pas réussi à confirmer que les LC expriment l'Ag vaccinale dans les NL après vaccination. Ces résultats restent donc à approfondir et à améliorer. En effet, la rareté des cellules positives pour l'Ag détectées par cytométrie ne nous permet pas de mettre en évidence le phénotype précis des cellules positives pour l'Ag. Le plasmide auxo-GTUMultiHIV<sub>B</sub> code plusieurs Ag vaccinaux (Martinon et al., 2009). Nous pourrions détecter le signal en utilisant plusieurs Ac dirigés contre les différents Ag de la multi-protéine vaccinale couplés avec un même fluorochrome pour espérer amplifier le signal et détecter un plus grand nombre de cellules. En effet, si l'épitope reconnu par l'Ac anti-p24 se trouve altéré lors de l'apprêtement de l'Ag par les cellules ou par le protocole d'extraction cellulaire, le nombre de cellules p24<sup>+</sup> peut se trouver diminué. L'utilisation simultanée d'Ac dirigés contre différents épitopes pourrait permettre de limiter ce problème.

Afin de renforcer l'hypothèse que les LC sont impliquées dans le processus vaccinal, il paraît nécessaire de réaliser des études fonctionnelles *in vitro* pour démontrer la capacité des LC, isolées après vaccination, à activer des lymphocytes T naïfs autologues. Le nombre de LC dans l'épiderme est faible, environ 1.8±1.5% et notre protocole génère une importante mortalité cellulaire. Après extraction, il serait nécessaire de trier les cellules épidermiques par tri magnétique puis par cytométrie en flux afin d'obtenir une fraction de LC la plus pure possible. Cependant ces deux méthodes ne présentent pas un rendement optimal et une importante quantité de cellules peut être perdue au cours de ces protocoles. Les quantités de peau nécessaire afin d'obtenir un nombre de LC suffisant à ce type d'étude seraient donc conséquentes et devraient être prélevées au cours d'une euthanasie. La difficulté de récupérer de grandes quantités de peau est de nouveau une des limitations non négligeable de notre modèle animal. Néanmoins, le développement de méthodes d'imagerie *in vivo* de plus en plus précises permet le suivi de processus biologiques en temps réel de façon moins invasive, grâce à l'administration de composés fluorescents ou radioactifs. Selon les méthodes utilisées il est possible de visualiser la mobilisation cellulaire en s'abolissant de la nécessité systématique de biopsier les zones d'intérêts.

En résumé, l'ensemble de ces résultats et les données de la littérature permettent d'émettre l'hypothèse que les cellules résidentes de la peau et notamment les APC ont un rôle dans le recrutement de cellules dérivées du sang et dans la capture, la présentation et l'activation des



lymphocytes naïfs. Les cellules inflammatoires quant à elles participeraient à la génération du microenvironnement nécessaire à la lutte contre les infections, à l'activation des DC résidentes et à l'orientation de la réponse immunitaires.

Au travers de ces travaux expérimentaux, nous avons caractérisé les événements cellulaires précoces ayant lieu suite à l'administration par voie i.d du vaccin ADN auxo-GTU associé à une EP locale. Nos résultats nous ont permis de décrire la cinétique de recrutement des populations participant au processus inflammatoire et de mobilisation des populations résidentes.

## 2. IDEC ou précurseurs de LC

De nombreuses études se sont intéressées à l'ontogénie et au renouvellement des LC dans l'épiderme (Seré et al., 2012; Merad et al., 2002; Hoeffel et al., 2012; Ginhoux et al., 2006). En effet, en condition normale ces cellules sont maintenues et renouvelées par des précurseurs locaux (Hoeffel et al., 2012; Merad et al., 2002). En cas d'inflammation, les LC quittent l'épiderme et sont renouvelées par des précurseurs dérivés des monocytes (Ginhoux et al., 2006; Seré et al., 2012). Seré et son équipe ont démontré, dans un modèle murin, que le renouvellement des LC après inflammation se faisait en 2 étapes. Dans un premier temps, un précurseur dérivé des monocytes inflammatoires CCR2<sup>+</sup>GR1<sup>high</sup> donne naissance à des LC à courte durée de vie, qui seront remplacées en quelques semaines par des LC à longue durée de vie issues d'un précurseur de la moelle osseuse. Les LC à courte durée de vie acquièrent l'expression de la langerine en quelques semaines et l'expriment à un niveau plus faible que les LC (Seré et al., 2012). Parallèlement, chez l'homme, les IDEC sont décrites comme CD206<sup>+</sup>, avec une expression plus faible du CD1a que les LC (Wollenberg and Mommaas, 2002) et qui ne présentent pas de granules de Birbek (Wollenberg et al., 1996). En accord avec la littérature, nos résultats montrent que les DC inflammatoires recrutées dans l'épiderme après vaccination expriment des niveaux de CD1a plus faible que les LC et n'expriment pas le CD207 en surface (Novak et al., 2004; Guttman-Yassky et al., 2007; Wollenberg and Mommaas, 2002). Cependant, nous n'avons pas vérifié l'expression du CD206 par ces cellules. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression de ce marqueur pour ainsi appuyer l'hypothèse que ces cellules inflammatoires sont bien des IDEC. De façon intéressante, nous avons constaté qu'une proportion non négligeable de ces cellules (21.1 n=2) exprime le CD207 en intracellulaire, ce qui suggère que ces cellules peuvent acquérir les caractéristiques de LC. De plus entre 24h et 8 jours post vaccination, les DC inflammatoires semblent augmenter l'expression du CD1a et perdre celle du CD1c, se rapprochant ainsi d'un phénotype de LC. Nous pouvons donc nous demander si les IDEC, décrites chez l'homme, recrutées dans l'épiderme suite à une inflammation ne pourraient pas correspondre

aux LC à courte durée de vie décrites par l'équipe de Séré chez la souris. Il serait donc nécessaire de vérifier l'expression par cette population inflammatoire du CD207, au cours au temps, en surface et en intracellulaire, afin de vérifier l'évolution de l'expression de ce marqueur caractéristique de LC. En effet nous avons réalisé cette étude uniquement au pic de recrutement de ces DC inflammatoires soit 72h post vaccination. Il est vrai que la rareté de ces cellules aux autres dates post vaccination rend cette investigation délicate. Il serait néanmoins intéressant de vérifier l'hypothèse que les IDEC puissent donner des LC à courte durée de vie.

### 3. L'implication de l'EP et de l'ADN dans la réponse immunitaire précoce

Les résultats obtenus au sein du laboratoire ont montré que le vaccin auxoGTUmultiHIV<sub>B</sub> engendrait une réponse de type cellulaire persistante et drastiquement augmentée grâce à une EP réalisée au niveau du site d'injection. Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes immunologiques impliqués dans l'induction de cette réponse particulièrement efficace, au niveau des sites injectés par le vaccin ADN systématiquement associé à une EP. Afin de connaître le rôle de l'ADN et de l'EP dans le processus inflammatoire, nous avons choisi d'étudier en parallèle un site injecté avec seulement du PBS, le solvant de l'ADN, en association avec une EP. En reproduisant les conditions expérimentales injection+EP, nous pouvons avoir accès à l'impact de la présence de l'ADN sur les mécanismes immunologiques impliqués dans notre stratégie de vaccination. Nous pouvons également étudier le rôle de l'injection et de l'EP indépendamment de la présence du vaccin sur ces mécanismes immunologiques au niveau du site PBS+EP. Comme contrôle, nous avons choisi de comparer ces résultats à la condition normale donc de la peau n'ayant reçu aucun traitement particulier.

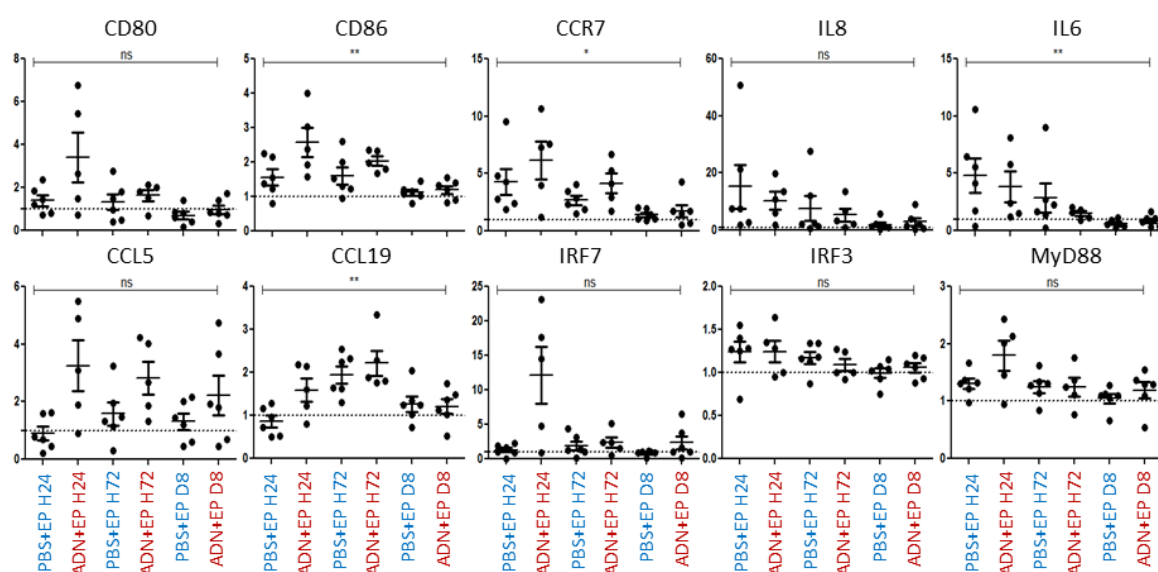
L'EP est initialement utilisée pour augmenter la pénétration de macromolécules comme l'ADN dans les cellules et ainsi d'augmenter la production d'Ag vaccinal (Roos et al., 2009; Zhang et al., 2002; Peng et al., 2007). Cependant nos résultats montrent que les mêmes populations inflammatoires comme les granulocytes, les macrophages inflammatoires, les cellules monocytaires ou encore les IDEC sont recrutées du côté ADN+EP et PBS+EP sans différence significative entre les deux sites, excepté pour les granulocytes qui sont recrutés en plus grand nombre en présence d'ADN dans le derme. Ces résultats démontrent que l'EP a un rôle essentiel dans l'induction du processus inflammatoire alors que l'ADN n'a finalement qu'un rôle très marginal dans les événements précoces de la réponse. De plus, nous avons observé un profil d'activation des LC et leurs mobilisations (recrutement puis migration) similaires entre les sites PBS+EP et ADN+EP. Là encore l'EP semble être responsable de l'activation de ces cellules indépendamment de la présence du vaccin et donc d'Ag.

Nous pouvons exclure l'hypothèse que les événements engendrés au niveau du site PBS+EP soient dus à la simple injection de PBS car nous avons démontré dans une autre étude que son injection n'engendrait ni activation ni recrutement cellulaire (manuscrit 4). Ces résultats, ainsi que ceux issus de la littérature (Babiuk et al., 2004a; Peng et al., 2007; Liu et al., 2008; Roos et al., 2009; Rizzuto et al., 1999), suggèrent très fortement un rôle adjuvant de l'EP. En effet l'EP engendre des dommages tissulaires de faible intensité qui se résolvent rapidement (Rizzuto et al., 1999; Peng et al., 2007), et une réponse inflammatoire, suspectée d'être importante dans l'activation du système immunitaire (Rizzuto et al., 1999; van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010; Peng et al., 2007). Une étude réalisée chez la souris suggère que l'inflammation engendrée par l'EP joue un rôle essentiel dans la facilitation de la présentation de l'Ag des vaccins ADN (Peng et al., 2007). Cette étude démontre qu'une EP effectuée avant l'injection du vaccin ADN permet de drastiquement amplifier la réponse immunitaire alors que seule une EP réalisée juste après l'injection de l'ADN permet d'augmenter la quantité d'Ag produite. Ces résultats très intéressants suggèrent que l'EP influence la réponse immunitaire au vaccin à deux niveaux : d'une part en augmentant la quantité d'Ag produite et d'autre part en exacerbant l'inflammation. L'exacerbation de l'inflammation apparaît avoir un rôle essentiel dans l'augmentation de la réponse immunitaire suite à une vaccination ADN associée à une EP. De plus une étude suggère que bien que les paramètres d'EP n'influencent que modérément, voire pas, la quantité d'Ag synthétisé, ils influencent l'intensité de la réponse immune subséquente (Babiuk et al., 2004a). En effet, il semble que plus les dommages tissulaires sont importants suite à une EP de forte intensité, plus la réponse immunitaire obtenue est intense (Babiuk et al., 2004a). La stratégie consistant à utiliser l'EP comme adjuvant pourrait se révéler intéressante au vu de certaines réticences de la population vis-à-vis des composés utilisés en tant qu'adjuvant dans les vaccins commerciaux. En effet, dans le cas de l'EP rien n'est additionné aux molécules vaccinales elles-mêmes.

Malgré tout, l'ADN n'est pas inerte dans la réponse vaccinale. Notre étude du microenvironnement au niveau du site d'injection montre une différence significative au niveau de la production de certains facteurs solubles entre le côté ADN+EP et le côté PBS+EP avec une production de facteur pro-inflammatoire plus importante du côté ADN+EP. De plus l'analyse très préliminaire des transcriptomes montre la même tendance (Figure 16). En effet, les ARNm de certaines protéines comme des molécules d'activation, des molécules impliquées dans la transduction du signal ou encore des cytokines et chimiokines sont synthétisées en quantité plus importante en présence d'ADN.

Il est vrai qu'au vu des résultats sur la mobilisation cellulaire, nous ne nous attendions pas à observer une différence au niveau moléculaire entre les sites PBS+EP et les sites ADN+EP. Il semble donc que

l'effet de l'ADN ne soit pas négligeable et qu'il ait finalement un rôle essentiel dans la génération d'un microenvironnement inflammatoire propice à une activation optimale des APC. En effet, la maturation des DC peut être suffisante pour permettre leur migration des tissus périphériques vers les NL (Ohl et al., 2004) mais cela ne signifie pas pour autant qu'elles pourront engendrer une réponse immunitaire si elles n'ont pas été suffisamment activées (Geissmann et al., 2002; Jonuleit et al., 2000). De plus, certains travaux ont démontré qu'en présence d'Ag mais en absence d'inflammation les APC de la peau induisaient une tolérance plutôt qu'une immunité (Hawiger et al., 2001).



**Figure 16: impact de la vaccination sur l'expression des gènes.**

Résultats préliminaires des puces à ADN obtenus à partir des ARN totaux extraits de la peau après ADN+EP et PBS+EP à différents temps post injection. Chaque valeur a été rapportée à la quantité d'ARN extrait de la peau saine sans traitement.

Nos résultats illustrant une production plus importante de facteurs pro-inflammatoires du côté ADN+EP que du côté PBS+EP sont en accords avec les résultats de l'équipe de Ross qui a montré une synergie entre l'ADN et l'EP sur l'induction de ces facteurs (Ross et al., 2009). Il est vrai qu'un nombre croissant d'études démontre un effet synergique sur l'induction de la réponse immunitaire lors de la stimulation simultanée de plusieurs PRR (Kasturi et al., 2011; Napolitani et al., 2005; Orr et al., 2014; Moody et al., 2014; Querec et al., 2006). Il serait donc intéressant de déterminer le ou les facteurs produits suite à l'EP (molécules du stress cellulaires par exemple) responsable de l'activation des DC et du recrutement des populations inflammatoires et de déterminer par quel PRR ils sont reconnus. D'un autre côté nous savons que l'ADN auxo-GTU est d'origine bactérienne et qu'il contient donc très probablement des motifs CpG, reconnus, entre autre, par le TLR9. Les cellules

capables de reconnaître l'ADN bactérien, peuvent en réponse, produire des molécules pro-inflammatoires indispensables à la génération du contexte inflammatoire permettant une bonne activation des APC (Tudor et al., 2005; Spies et al., 2003). Cependant, lors de nos expériences *in vitro* de stimulation de suspension épidermique et dermique ou des macrophages dérivés des monocytes sanguins avec l'ADN vaccinal, nous n'avons pas observé de changement au niveau de l'expression des marqueurs d'activation. Cependant, il est décrit que les LC n'expriment pas le TLR9 (Merad et al., 2013; Flacher et al., 2006), au contraire des kératinocytes (Lebre et al., 2007). Nous pouvons donc nous attendre à une activation indirecte des LC par l'intermédiaire de facteurs produits par les kératinocytes après leur reconnaissance de l'ADN. En effet, nous avons mis en évidence la possibilité d'activer de façon indirecte les LC par l'intermédiaire d'un facteur soluble, le TNF- $\alpha$  produit par les macrophages et les granulocytes en réponse à la reconnaissance d'un ligand de TLR (manuscrit 4). Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'effet de l'ADN sur les DDC ou les macrophages (résultats non montrés). Nous pouvons supposer que nos conditions *in vitro* ne permettent probablement pas de reproduire les conditions nécessaires à la reconnaissance de l'ADN bactérien *in vivo*. Pourtant, les données préliminaires du transcriptome montrent une augmentation de la synthèse d'ARNm codant MyD88 (Figure 16), une molécule adaptatrice impliquée dans la signalisation cellulaire après stimulation des PRR (Figure 1). Or le TLR9 transmet le signal lors de la reconnaissance des motifs CpG via la molécule MyD88. Il est donc possible que cette augmentation de l'ARNm de MyD88 soit une conséquence de la stimulation du TLR9.

En résumé, nos résultats démontrent l'importance de l'EP sur le recrutement de cellules inflammatoires et l'activation de certaines DC, ce qui suggère un rôle adjuvant de l'EP. Nos résultats démontrent également l'importance de l'ADN dans la génération d'un microenvironnement inflammatoire optimal pour l'activation des DC et par voie de conséquence pour leur capacité à induire une réponse de type cellulaire puissante et persistante.

### III- Le modèle animal et ses limites

Dans le cadre de notre stratégie vaccinale par le vaccin auxo-GTU, les résultats de l'essai clinique d'Afrique du Sud, montrent, comme dans notre modèle, une stimulation de la réponse cellulaire avec une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag vaccinal (Vardas et al., 2012). Cependant les lymphocytes spécifiques lors de cet essai sont majoritairement monofonctionnels sécréteurs d'INF- $\gamma$  même si un pourcentage de ces lymphocytes est polyfonctionnel et sécrète de l'INF- $\gamma$  et de l'IL2 ou de l'INF- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . Cependant dans notre modèle, les CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'Ag sont majoritairement polyfonctionnels capables de

sécréter INF- $\gamma$  et IL2. Le TNF- $\alpha$  n'avait pas été mesuré dans notre étude préclinique (Martinon et al., 2009). Les résultats d'immunogénicité de cet essai clinique d'Afrique du Sud et de notre étude préclinique chez le macaque cynomolgus sont néanmoins difficiles à comparer. En effet les animaux de notre étude ne sont pas infectés par le SIV (utilisé en tant que modèle du VIH), ils ne sont donc pas immunodéprimés et sont séronégatifs pour les Ag vaccinaux. L'essai en Afrique du Sud a été réalisé chez des individus infectés par le VIH en phase chronique et sans traitement antirétroviral. La différence qualitative observée dans la réponse cellulaire pourrait être due, d'une part à l'immunodéficience et, d'autre part, à l'immunité pré-existante contre les Ag vaccinaux chez les patients infectés.

Par ailleurs, nous avons montré la similarité entre les populations immunitaires peuplant la peau chez le macaque cynomolgus et chez l'homme ce qui suggère que les mêmes populations immunitaires impliquées dans la réponse vaccinale chez le macaque pourraient être impliquées chez l'homme. Cependant des divergences au niveau de l'expression de certains marqueurs cellulaires au sein de ces populations ont été constatées comme l'expression de la Langerine par les DDC CD1a<sup>+</sup> simiennes ou la non-expression du CD1c par les LC simiennes. Ces marqueurs sont impliqués dans la reconnaissance et la présentation des Ag respectivement. Il est donc envisageable que ces différences d'expression aient des impacts sur le rôle des différentes populations dans la réponse vaccinale précoces et par voie de conséquence sur la réponse immunitaire adaptative.

#### IV- Perspectives : La vaccination par le vaccin ADN auxo-GTU et l'électroporation

Les vaccins ADN sont très intéressants pour leur innocuité (Bråve et al., 2010; Martin et al., 1999; Ulmer et al., 2006), leur stabilité et leur coût relativement modéré par rapport aux autres types de vaccins (Donnelly et al., 1997). Ces caractéristiques permettent d'envisager l'utilisation des vaccins ADN pour la vaccination de masse. D'ailleurs, quatre vaccins commerciaux sont disponibles pour la vaccination vétérinaire : un chez le cheval contre le virus du Nil occidental, un chez le saumon contre le virus de la nécrose hématopoïétique, un chez le porc en thérapie génique et un chez le chien en vaccin thérapeutique contre les mélanomes (Flingai et al., 2013).

Les plasmides GTU codent une protéine additionnelle à la protéine vaccinale : la protéine E2 du papillomavirus bovin. Cette dernière permet une conservation du plasmide vaccinal dans les cellules transfectées plus longue par rapport à un plasmide classique (Blazevic et al., 2006; Krohn et al., 2005). Par conséquent, les vaccins GTU engendrent une réponse immunitaire prolongée par rapport à celle induite par un plasmide classique ne codant pas E2 (Blazevic et al., 2006). La vaccination ADN

avec la technologie GTU et plus précisément auxo-GTU (sans antibiotique de sélection) (Krohn et al., 2005) est donc très intéressante pour la vaccination chez l'homme. Le vaccin auxo-GTUMultiHIV<sub>B</sub> a d'ailleurs été testé dans plusieurs essais cliniques de phase I et II chez des volontaires sains et des patients infectés par le VIH (Vardas et al., 2012; Krohn et al., 2005). Les résultats de l'essai réalisé en Afrique du Sud montrent que la vaccination par le plasmide auxo-GTUMultiHIV<sub>B</sub> sans EP induit chez les personnes infectées par un VIH de clade C, ne suivant pas de traitement antirétroviral, une augmentation du nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> et une diminution de la charge virale (Vardas et al., 2012). Bien que ces effets soient modérés, une réactivité croisée entre différents sous types de VIH est pour la première fois observée.

Le vaccin auxo-GTUMultiHIV<sub>B</sub> engendre une réponse immunitaire de type cellulaire. Or dans le cadre de la vaccination prophylactique contre le VIH, il semble qu'une immunité à composante cellulaire et humorale soit souhaitée (Barouch and Korber, 2010). Ce vaccin pourrait être additionné d'un adjuvant capable d'induire en plus de la composante cellulaire, la composante humorale qui lui fait défaut. Il pourrait également être combiné à un autre vaccin pour engendrer la composante humorale comme le montrent les travaux de l'équipe de Blazevic (Brâve et al., 2009). La vaccination ADN est également très intéressante dans le cadre d'une stratégie de «prime-boost». L'efficacité d'un « prime » ADN a d'ailleurs été soulignée dans plusieurs études (Babiuk et al., 2002; Casimiro et al., 2003a; Hutnick et al., 2011). La vaccination primaire serait réalisée avec le vaccin auxo-GTUMultiHIV<sub>B</sub> en association avec une EP locale afin d'induire une réponse cellulaire polyvalente puissante et persistante contre les Ag vaccinaux. Le rappel hétérologue serait réalisé avec une autre construction vaccinale plus adaptée à l'induction d'une réponse humorale. Un vecteur viral pourrait être utilisé, car il induit de fortes réponses cellulaires et humorales, ou une protéine vaccinale adjuvantée, connue pour induire plutôt des réponses humorales.

L'EP est néanmoins un geste impressionnant, voire douloureux lorsqu'il est pratiqué par voie intramusculaire, ce qui rend la stratégie de vaccination par de l'ADN en association à une EP difficile à appliquer dans l'objectif de remplacer une stratégie de vaccination existante. Cependant l'intense réponse immunitaire induite par ce vaccin même en absence d'EP par rapport à des vaccins ADN plus classiques (Martinon et al., 2009; Blazevic et al., 2006) pourrait permettre d'induire une réponse immunitaire suffisamment intense pour être protectrice contre certaines maladies infectieuses. La protéine vaccinale de cette construction plasmidique peut en effet être facilement remplacée par d'autres protéines afin d'être utilisée pour vacciner contre d'autres pathogènes. Il serait donc intéressant de tester chez le primate non humain l'induction d'une réponse immunitaire par la vaccination auxo-GTU sans EP contre une maladie infectieuse comme la grippe. En effet bien que des vaccins existent contre la grippe saisonnière, il est nécessaire de se vacciner tous les ans car le virus a

un haut taux de mutation. Ce fort taux de mutation engendre un important taux de variabilité dans la population de virus grippaux. Les vaccins anti-grippaux existant sont principalement des vaccins à virus inactivés. Ils engendrent une réponse immunitaire de type humoral avec un spectre insuffisamment large pour protéger contre les variants circulant d'une année sur l'autre. La réponse immunitaire induite par le vaccin ADN de type GTU pourrait permettre d'obtenir une forte réponse cellulaire contre des protéines conservées du virus influenza A, et ainsi permettre d'engendrer une réponse immunitaire avec un spectre plus large pour lutter contre les différents variants. De plus les virus influenza A sont capables d'infecter l'homme ainsi que plusieurs espèces animales comme le porc ou les volailles. L'utilisation d'un vaccin de type GTU codant des protéines conservées permettrait d'envisager des campagnes de vaccination des animaux d'élevages et des hommes pour tenter de freiner la contamination interspèce.

La stratégie vaccinale par de l'ADN a un autre avantage, celui de pouvoir coder directement des protéines possédant un rôle d'adjuvant comme les cytokines et les chimiokines (Jalah et al., 2012; Hutnick et al., 2011; Su et al., 2012). En effet ce type d'adjuvant permet d'orienter la réponse immunitaire de façon précise et naturelle. Cependant ce sont des molécules coûteuses peu intéressantes en tant qu'adjuvant pour la vaccination de masse d'un point de vue économique. La possibilité d'ajouter les séquences codant ces protéines dans le plasmide vaccinal ou dans un plasmide additionnel présente donc un réel avantage puisque la synthèse d'ADN est, en elle-même, peu onéreuse.

L'EP, utilisée dans notre stratégie vaccinale, est une des méthodes permettant d'augmenter l'immunogénicité des vaccins ADN, parmi les plus efficaces (Flingai et al., 2013). Les réponses immunitaires obtenues sont, dans certains cas, supérieures à celles obtenues avec des vaccins viraux très immunogènes (Flingai et al., 2013) ce qui démontre l'intérêt des vaccins de type ADN associés à une EP. Plusieurs essais cliniques de phase I/II ont été ou sont réalisés avec des vaccins de type ADN associés à une EP. Le profil d'innocuité de l'EP après la vaccination ADN est démontré dans ces différents essais et est considéré comme similaire au vaccin ADN sans EP (Flingai et al., 2013). L'effet défavorable le plus couramment reporté est une douleur modérée à sévère associée au processus d'EP (Bagarazzi et al., 2012; Low et al., 2009; Diaz et al., 2013). Cependant il a été montré en parallèle que, dans le cadre d'une EP i.m, cette douleur n'était majoritairement pas associée à une augmentation sanguine de marqueurs liés à des dommages musculaires (Low et al., 2009; Diaz et al., 2013). De plus, les effets défavorables sont de courte durée, de l'ordre de quelques minutes, et se résolvent complètement en 1 à 2 jours. Les participants à ces essais cliniques indiquent majoritairement qu'ils sont favorables à ce processus dans le but de protéger contre de graves maladies.



Les stratégies de vaccination par des vaccins ADN associés à une EP sont testées dans le cadre de vaccins prophylactiques (Vasan et al., 2011), dans le cadre de vaccins thérapeutiques (Weiland et al., 2013), ainsi que dans le cadre de la vaccination anticancéreuse (Diaz et al., 2013; van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010). L'augmentation de l'immunogénicité induite par l'EP est reportée dans toutes les études incluant une comparaison avec l'injection seul de l'ADN (Vasan et al., 2011; Low et al., 2009). Parmi ces différents essais, nous pouvons citer à titre d'exemple le candidat vaccin ADN anti-VIH ADVAX administré par voie intramusculaire suivie d'une EP chez des volontaires séronégatifs pour le VIH (Vasan et al., 2009, 2011). Cet essai de phase I/II démontre l'innocuité de l'EP, une claire augmentation de la réponse de type cellulaire induite par l'EP en comparaison à l'administration de l'ADN seul et un effet dose. Cependant ce vaccin n'induit pas de réponse humorale.

L'essai clinique de phase I utilisant le candidat vaccin VGX-3100 contre les sérotypes 16 et 18 du papillomavirus humain (HPV) a montré chez des femmes, ayant été traitées pour des néoplasies du col de l'utérus de grade 2 ou 3, une puissante et persistante réponse humorale ainsi qu'une robuste réponse cellulaire spécifique présentant un profil Th1 et des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de type CTL (Bagarazzi et al., 2012). Cet essai met en lumière la capacité des vaccins ADN associés à une EP à induire une robuste réponse immunitaire contre des protéines généralement peu immunogéniques et à induire un profil de réponse supposé nécessaire pour éliminer une infection persistante. La forte production d'Ac serait intéressante pour protéger l'organisme de l'acquisition de l'infection et la forte réponse cellulaire pourrait permettre de détruire les cellules déjà infectées. Les femmes de cet essai ayant été traitées pour des néoplasies sont potentiellement infectées par les HPV 16 ou 18. Cela suggère que la vaccination ADN associée à une EP est efficace même après l'acquisition de l'infection ce qui n'est pas suggéré pour les vaccins anti-HPV existant. La réponse de type CTL pourrait permettre la régression des cancers chez les femmes infectées par le(s) HPV. Son efficacité sur la clairance tumorale est d'ailleurs testée dans un essai de phase 2 chez des femmes présentant des grades sévères de niveau 2 et 3 de dysplasies attribuées aux HPV 16 ou 18. Cette approche vaccinale pourrait donc être particulièrement intéressante contre les pathogènes viraux potentiellement responsables de cancers.

Les vaccins ADN dont l'immunogénicité est augmentée par l'EP, paraissent donc particulièrement intéressants pour la vaccination thérapeutique dans le cadre d'infections virales chroniques. Le profil cellulaire et la réponse de type CTL potentiellement induite pourrait permettre un contrôle de la charge virale à un niveau faible voir indétectable. Ces effets permettraient de s'abolir des traitements antiviraux, certes efficaces mais présentant une toxicité non négligeable pour les patients. Un essai de phase I a été réalisé chez des individus séropositifs pour l'hépatite C en phase chronique afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité d'un vaccin ADN thérapeutique associé à une EP

contre le virus de l'hépatite C. Les résultats de cet essai montrent un impact de la vaccination sur la charge virale et la réponse cellulaire cependant ces effets ne sont que temporaires. Néanmoins, combinée à un traitement antiviral, une clairance virale a été obtenue chez plusieurs patients (Weiland et al., 2013).

D'autres essais en thérapie anticancéreuse sont réalisés visant à augmenter l'immunogénicité contre des molécules associées aux cancers (van Drunen Littel-van den Hurk and Hannaman, 2010). Cependant, bien que des réponses immunitaires soient induites contre les protéines accessoires codées par les vaccins ADN, une augmentation de l'immunogénicité contre les protéines vaccinales associées aux cancers n'a pas été observée comme dans les travaux réalisés par l'équipe de Motero (Diaz et al., 2013). Les Ag tumoraux du soi sont généralement faiblement immunogéniques, ce qui peut expliquer l'échec de cet essai. De même les patients inclus dans cet essai présentaient des profils hétérogènes avec différents stade de cancer. Un certain nombre d'individus présentaient en effet des métastases. Or les cancers échappent à la surveillance immunologique en induisant des processus de tolérance avec la génération entre autres, de lymphocytes spécifiques Treg. Les auteurs évoquent que peu de stratégies vaccinales ont montré une efficacité dans le cadre de cancer présentant des métastases, alors que des stratégies vaccinales montrent une efficacité dans des cancers à des stades moins avancés. Ils suggèrent donc que cette stratégie pourrait être efficace chez des patients ne présentant pas encore de métastases. La stratégie de vaccination par de l'ADN associée à une électroporation pourrait également être additionnée d'un adjuvant pour augmenter l'immunogénicité des protéines tumorales du soi et ainsi espérer rompre le processus de tolérance.

## CONCLUSION

Au cours de notre étude, nous avons identifié les événements cellulaires et moléculaires précoces mis en place localement suite à la stratégie de vaccination par le vaccin de type ADN auxo-GTU associée à une EP locale. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de l'établissement d'une forte réponse immunitaire de type cellulaire.

Dans cette étude, nous nous sommes systématiquement placés dans le contexte d'une vaccination primaire. Or, la stratégie de vaccination par le vaccin auxo-GTU requiert des rappels de vaccination pour être efficace. Il serait donc intéressant d'étudier la dynamique de la réponse immunitaire locale également dans le contexte de rappels vaccinaux afin de mettre en évidence une réponse similaire ou différente par rapport à celle induite lors d'une vaccination primaire. Nous n'avons pas observé d'impact de notre stratégie vaccinale sur la population lymphocytaire résidente de la peau dans le cadre d'une vaccination primaire. Dans le contexte d'un rappel vaccinal nous pourrions observer un recrutement de lymphocytes spécifiques de l'Ag au niveau du site d'injection. La présence de ces cellules effectrices pourrait avoir une influence sur la réponse immunitaire locale, sur le recrutement de cellules inflammatoires ainsi que sur le microenvironnement généré.

Il serait également intéressant de comparer la réponse immunitaire induite par ce vaccin par la voie i.m, plus classique, afin de mettre en évidence un potentiel impact de la voie d'immunisation sur la réponse immunitaire. En effet les résultats de l'essai clinique d'Afrique du Sud avec le vaccin GTUmultiHIV<sub>B</sub> montrent une meilleure efficacité vaccinale par voie i.m que par voie i.d (Vardas et al., 2012). Il paraît donc important de caractériser la réponse induite par ces deux voies de vaccination.

Nos résultats mettent en évidence un rôle essentiel de l'EP dans le processus inflammatoire et l'activation de certaines populations de DC comme les LC. Afin de vérifier le potentiel adjuvant de l'EP, nous envisageons de tester l'EP dans un contexte de vaccination non ADN. Les vaccins protéiques induisent de faibles réponses immunitaires (Perrie et al., 2008). Nous prévoyons donc d'étudier la réponse immunitaire induite suite à une vaccination i.d par l'Ag Gag seul ou en association avec une EP locale. Nous pourrions ainsi vérifier si l'EP en elle-même permet une augmentation de la réponse immunitaire ou si la synergie entre l'ADN et l'EP est indispensable pour augmenter cette réponse. Une expérience similaire chez la souris n'a pas montré d'effet adjuvant de l'EP dans le cadre d'une vaccination par un vecteur viral (Liu et al., 2008). Mais les vecteurs viraux induisent de fortes réponses inflammatoires par eux-mêmes et n'ont donc probablement pas besoin de l'inflammation engendrée par l'EP. En revanche, les vaccins protéiques induisant une

inflammation plus faible pourraient bénéficier de cet effet adjuvant apporté par l'EP comme le montrent les travaux de l'équipe de Babiuk chez le porc (Babiuk et al., 2002).

L'étude cinétique de la réponse vaccinale locale induite suite à l'administration du vaccin auxo-GTU que nous avons réalisé a impliqué de sélectionner certaines conditions vaccinales ou contrôles par rapport à d'autres car nous sommes limités au niveau du nombre de biopsies réalisables par animal. Nous avons par conséquent choisi d'étudier la condition ADN+EP qui a montré les meilleurs résultats au niveau de la réponse adaptative induite par rapport à la condition ADN seul, et la condition PBS+EP comme contrôle. Il serait cependant nécessaire pour compléter notre travail d'étudier les événements cellulaires et moléculaires au niveau de sites ADN seul. Nous pourrions ainsi vérifier la capacité de l'ADN à induire un contexte inflammatoire et une activation des APC. En effet nos résultats sur le microenvironnement, générés suite à la vaccination, montrent des différences significatives au niveau de la production de facteurs solubles. Aux sites ADN+EP, une production de facteurs pro-inflammatoires plus importante est mise en évidence par rapport aux sites PBS+EP, ce qui démontre que l'ADN ou l'Ag protéique joue un rôle essentiel dans la génération du microenvironnement local. Or, le microenvironnement inflammatoire est indispensable à la bonne activation des DC et donc à l'induction subséquente d'une immunité spécifique.

Dans l'état actuel de nos capacités technologiques, nous n'avons pas pu étudier l'implication de cellules du système immunitaire comme les mastocytes, les lymphocytes B ou encore les NK dans les processus d'inflammation locale et de réponse au vaccin. Pourtant, les mastocytes, qui sont des cellules résidentes de la peau, ont un rôle important dans la sécrétion de facteurs solubles en cas de stimulation (Kupper and Fuhlbrigge, 2004). Les travaux de l'équipe d'Abraham montrent notamment l'importance des mastocytes dans l'amplification de la réponse adaptative dans un processus vaccinal. L'administration avec l'Ag de molécules activatrices des mastocytes permet d'augmenter la migration des DC dans les nœuds lymphatiques et amplifient la production d'Ac. Ces auteurs suggèrent que des molécules activant les mastocytes pourraient être de potentiels adjuvants (McLachlan et al., 2008). L'étude de l'implication des mastocytes dans notre modèle vaccinale paraît donc intéressante. Les lymphocytes B (Geherin et al., 2012) peuvent également, être recrutés en condition inflammatoire, notamment dans le cadre d'une vaccination ADN+EP (Liu et al., 2008) et contribuer à la réponse immunitaire. Afin de compléter nos résultats et ainsi d'avoir une caractérisation encore plus précise de la réponse innée ayant lieu au cours de cette stratégie de vaccination, il serait donc nécessaire de caractériser ces différentes populations et d'étudier leurs implications dans le processus vaccinal.

## BIBLIOGRAPHIE

- Van der Aar, A.M.G., R.M.R. Sylva-Steenland, J.D. Bos, M.L. Kapsenberg, E.C. de Jong, and M.B.M. Teunissen. 2007. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J. Immunol.* 178:1986–90.
- Abadie, V., E. Badell, P. Douillard, D. Ensergueix, P.J.M. Leenen, M. Tanguy, L. Fiette, S. Saeland, B. Gicquel, and N. Winter. 2005. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*. 106:1843–1850. doi:10.1182/blood-2005-03-1281.Supported.
- Abdoli, A., H. Soleimanzahi, F. Fotouhi, A. Teimoori, S. Pour Beiranvand, and Z. Kianmehr. 2013. Human Papillomavirus Type16- L1 VLP Production in Insect Cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16:891–5.
- Abroi, A., I. Ilves, S. Kivi, and M. Ustav. 2004. Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J. Virol.* 78:2100–2113. doi:10.1128/JVI.78.4.2100.
- Akbari, O., N. Panjwani, S. Garcia, R. Tascon, D. Lowrie, and B. Stockinger. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 189:169–78.
- Ambarus, C. a, S. Krausz, M. van Eijk, J. Hamann, T.R.D.J. Radstake, K. a Reedquist, P.P. Tak, and D.L.P. Baeten. 2012. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods.* 375:196–206. doi:10.1016/j.jim.2011.10.013.
- Ambrose, C.S., C. Luke, and K. Coelingh. 2008. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. *Influenza Other Respi. Viruses.* 2:193–202. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00056.x.
- Von Andrian, U.H., and T.R. Mempel. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3:867–78. doi:10.1038/nri1222.
- Angel, C.E., A. Lala, C.-J.J. Chen, S.G. Edgar, L.L. Ostrovsky, and P.R. Dunbar. 2007. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int. Immunol.* 19:1271–9. doi:10.1093/intimm/dxm096.
- Anthony, R.M., J.F. Urban, F. Alem, H. a Hamed, C.T. Roza, J.-L. Boucher, N. Van Rooijen, and W.C. Gause. 2006. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat. Med.* 12:955–60. doi:10.1038/nm1451.
- Arnou, R., G. Icardi, M. De Decker, A. Ambrozaitis, M.-P. Kazek, F. Weber, and P. Van Damme. 2009. Intradermal influenza vaccine for older adults: a randomized controlled multicenter phase III study. *Vaccine.* 27:7304–12. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.033.

- Autissier, P., C. Soulas, T.H. Burdo, and K.C. Williams. 2010a. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry. A*. 77:410–9. doi:10.1002/cyto.a.20859.
- Autissier, P., C. Soulas, T.H. Burdo, and K.C. Williams. 2010b. Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: clarification on DC heterogeneity. *J. Immunol. Methods*. 360:119–28. doi:10.1016/j.jim.2010.06.017.
- Baba, T.W., V. Liska, a H. Khimani, N.B. Ray, P.J. Dailey, D. Penninck, R. Bronson, M.F. Greene, H.M. McClure, L.N. Martin, and R.M. Ruprecht. 1999. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat. Med*. 5:194–203. doi:10.1038/5557.
- Babiuk, S., M.E. Baca-Estrada, M. Foldvari, D.M. Middleton, D. Rabussay, G. Widera, and L. a Babiuk. 2004a. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. *J. Biotechnol*. 110:1–10. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.01.015.
- Babiuk, S., M.E. Baca-Estrada, M. Foldvari, M. Storms, D. Rabussay, G. Widera, and L. a Babiuk. 2002. Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals. *Vaccine*. 20:3399–3408.
- Babiuk, S., N. Mookherjee, R. Pontarollo, P. Griebel, S. van Drunen Littel-van den Hurk, R. Hecker, and L. Babiuk. 2004b. TLR9<sup>-/-</sup> and TLR9<sup>+/+</sup> mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology*. 113:114–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01938.x.
- Bachy, V., C. Hervouet, P.D. Becker, L. Chorro, L.M. Carlin, S. Herath, T. Papagatsias, J.-B. Barbaroux, S.-J. Oh, A. Benlahrech, T. Athanasopoulos, G. Dickson, S. Patterson, S.-Y. Kwon, F. Geissmann, and L.S. Klavinskis. 2013. Langerin negative dendritic cells promote potent CD8<sup>+</sup> T-cell priming by skin delivery of live adenovirus vaccine microneedle arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 110:3041–6. doi:10.1073/pnas.1214449110.
- Baeke, F., H. Korf, L. Overbergh, E. van Etten, A. Verstuyf, C. Gysemans, and C. Mathieu. 2010. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the immune system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 121:221–7. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.037.
- Bagarazzi, M.L., J. Yan, M.P. Morrow, X. Shen, R.L. Parker, J.C. Lee, M. Giffear, P. Pankhong, A.S. Khan, K.E. Broderick, C. Knott, F. Lin, J.D. Boyer, R. Draghia-Akli, C.J. White, J.J. Kim, D.B. Weiner, and N.Y. Sardesai. 2012. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci. Transl. Med*. 4:155ra138. doi:10.1126/scitranslmed.3004414.
- Baldwin, S.L., S. Bertholet, V. a Reese, L.K. Ching, S.G. Reed, and R.N. Coler. 2012. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. *J. Immunol*. 188:2189–97. doi:10.4049/jimmunol.1102696.

- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392:245–52. doi:10.1038/32588.
- Banchereau, J., L. Thompson-Snipes, S. Zurawski, J.-P. Blanck, Y. Cao, S. Clayton, J.-P. Gorvel, G. Zurawski, and E. Klechevsky. 2012. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood*. 119:5742–9. doi:10.1182/blood-2011-08-371245.
- Barouch, D.H., and B. Korber. 2010. HIV-1 vaccine development after STEP. *Annu. Rev. Med.* 61:153–67. doi:10.1146/annurev.med.042508.093728.
- Baumgarth, N., and M. Roederer. 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods*. 243:77–97.
- Baxevanis, C.N., I.F. Voutsas, and O.E. Tsitsilonis. 2013. Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. *Immunotherapy*. 5:497–511. doi:10.2217/imt.13.24.
- Belshe, R.B., F.K. Newman, K. Wilkins, I.L. Graham, E. Babusis, M. Ewell, and S.E. Frey. 2007. Comparative immunogenicity of trivalent influenza vaccine administered by intradermal or intramuscular route in healthy adults. *Vaccine*. 25:6755–63. doi:10.1016/j.vaccine.2007.06.066.
- Van den Berg, J.H., B. Nuijen, J.H. Beijnen, A. Vincent, H. van Tinteren, J. Kluge, L. a E. Woerdeman, W.E. Hennink, G. Storm, T.N. Schumacher, and J.B. a G. Haanen. 2009. Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum. Gene Ther.* 20:181–9. doi:10.1089/hgt.2008.073.
- Bevan, M. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143:1283–1288.
- Birbeck, M.S., A.S. Breathnach, and J.D. Everall. 1961. An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo1. *J. Invest. Dermatol.* 37:51–64. doi:10.1038/jid.1961.80.
- Blazevic, V., A. Männik, M. Malm, R. Sikut, M. Valtavaara, U. Toots, M. Ustav, and K. Krohn. 2006. Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with a novel gene transport unit (GTU)-MultiHIV DNA vaccine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 22:667–77. doi:10.1089/aid.2006.22.667.
- Bobr, A., B. Igyarto, and K. Haley. 2012. Autocrine/paracrine TGF- $\beta$ 1 inhibits Langerhans cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:10492–10497. doi:10.1073/pnas.1119178109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1119178109.
- Bond, E., W.C. Adams, A. Smed-Sörensen, K.J. Sandgren, L. Perbeck, A. Hofmann, J. Andersson, and K. Loré. 2009. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *J. Immunol. Methods*. 348:42–56. doi:10.1016/j.jim.2009.06.012.

- Brandner, J.M., S. Kief, C. Grund, M. Rendl, P. Houdek, C. Kuhn, E. Tschachler, W.W. Franke, and I. Moll. 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 81:253–63. doi:10.1078/0171-9335-00244.
- Bråve, A., L. Gudmundsdotter, E. Sandström, B.K. Haller, D. Hallengård, A.-K. Maltais, A.D. King, R.R. Stout, P. Blomberg, U. Höglund, B. Hejdeman, G. Biberfeld, and B. Wahren. 2010. Biodistribution, persistence and lack of integration of a multigene HIV vaccine delivered by needle-free intradermal injection and electroporation. *Vaccine.* 28:8203–9. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.108.
- Bråve, A., D. Hallengård, M. Malm, V. Blazeovic, E. Rollman, I. Stanescu, and K. Krohn. 2009. Combining DNA technologies and different modes of immunization for induction of humoral and cellular anti-HIV-1 immune responses. *Vaccine.* 27:184–6. doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.041.
- Brown, K.N., A. Trichel, and S.M. Barratt-Boyes. 2007. Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J. Immunol.* 178:6958–67.
- Bruel, T., S. Dupuy, T. Démoulins, C. Rogez-Kreuz, J. Dutrieux, A. Corneau, A. Cosma, R. Cheynier, N. Dereuddre-Bosquet, R. Le Grand, and B. Vaslin. 2014. Plasmacytoid dendritic cell dynamics tune interferon-alfa production in SIV-infected cynomolgus macaques. *PLoS Pathog.* 10:e1003915. doi:10.1371/journal.ppat.1003915.
- Bursch, L.S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D.H. Kaplan, and K. a Hogquist. 2007. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204:3147–56. doi:10.1084/jem.20071966.
- Butcher, E., and L. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (80- ).* 272:60–66.
- Cardoso, a I., M. Blixenkrone-Moller, J. Fayolle, M. Liu, R. Buckland, and T.F. Wild. 1996. Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. *Virology.* 225:293–9. doi:10.1006/viro.1996.0603.
- Casimiro, D., L. Chen, and T. Fu. 2003a. immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency. *J. ....* 77:6305–6313. doi:10.1128/JVI.77.11.6305.
- Casimiro, D.R., L. Chen, T.-M. Fu, R.K. Evans, M.J. Caulfield, M.-E. Davies, A. Tang, M. Chen, L. Huang, V. Harris, D.C. Freed, K.A. Wilson, S. Dubey, D.-M. Zhu, D. Nawrocki, H. Mach, R. Troutman, L. Isopi, D. Williams, W. Hurni, Z. Xu, J.G. Smith, S. Wang, X. Liu, L. Guan, R. Long, W. Trigona, G.J. Heidecker, H.C. Perry, N. Persaud, T.J. Toner, Q. Su, X. Liang, R. Youil, M. Chastain, A.J. Bett, D.B. Volkin, E.A. Emini, and J.W. Shiver. 2003b. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* 77:6305–13.



- Cerboni, S., M. Gentili, and N. Manel. 2013. Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. 120. 1st ed. Elsevier Inc.
- Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, M.D. Daniel, R.C. Desrosiers, P. Tiollais, and P. Sonigo. 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature*. 328:543–7. doi:10.1038/328543a0.
- Chakravarti, A., I. Allaey, and P. Poubelle. 2007. Neutrophile et immunité: Est-ce inné ou acquis? *MS. Médecine Sci*. 23:862–867.
- Chattergoon, M. a, T.M. Robinson, J.D. Boyer, and D.B. Weiner. 1998. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J. Immunol*. 160:5707–18.
- Chen, H., B. Wen, Y. Deng, W. Wang, X. Yin, J. Guan, L. Ruan, and W. Tan. 2011. Enhanced effect of DNA immunization plus in vivo electroporation with a combination of hepatitis B virus core-PreS1 and S-PreS1 plasmids. *Clin. Vaccine Immunol*. 18:1789–95. doi:10.1128/CVI.05113-11.
- Cheong, C., I. Matos, J.-H. Choi, D.B. Dandamudi, E. Shrestha, M.P. Longhi, K.L. Jeffrey, R.M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C.G. Park, and R.M. Steinman. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 143:416–29. doi:10.1016/j.cell.2010.09.039.
- Chodaczek, G., V. Papanna, M.A. Zal, and T. Zal. 2012. Body-barrier surveillance by epidermal  $\gamma\delta$  TCRs. *Nat. Immunol*. 13:272–82. doi:10.1038/ni.2240.
- Chu, C.-C., N. Ali, P. Karagiannis, P. Di Meglio, A. Skowera, L. Napolitano, G. Barinaga, K. Grys, E. Sharif-Paghaleh, S.N. Karagiannis, M. Peakman, G. Lombardi, and F.O. Nestle. 2012. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med*. 209:935–45. doi:10.1084/jem.20112583.
- Chu, C.-C., P. Di Meglio, and F.O. Nestle. 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin. Immunol*. 23:28–41. doi:10.1016/j.smim.2011.01.006.
- Clark, R. a, R. Watanabe, J.E. Teague, C. Schlapbach, M.C. Tawa, N. Adams, A. a Dorosario, K.S. Chaney, C.S. Cutler, N.R. Leboeuf, J.B. Carter, D.C. Fisher, and T.S. Kupper. 2012. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci. Transl. Med*. 4:117ra7. doi:10.1126/scitranslmed.3003008.
- Clark, R.A., B. Chong, N. Mirchandani, N.K. Brinster, K. Yamanaka, R. Dowgiert, and T.S. Kupper. 2006. The Vast Majority of CLA+ T Cells Are Resident in Normal Skin. *J. Immunol*. 176:4431–4439.

- Condon, C., S.C. Watkins, C.M. Celluzzi, K. Thompson, and L.D. Falo. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1122–1128. doi:10.1038/nm1096-1122.
- Conrad, C., S. Meller, and M. Gilliet. 2009. Plasmacytoid dendritic cells in the skin: to sense or not to sense nucleic acids. *Semin. Immunol.* 21:101–9. doi:10.1016/j.smim.2009.01.004.
- Contreras, V., C. Urien, R. Guiton, Y. Alexandre, T.-P. Vu Manh, T. Andrieu, K. Crozat, L. Jouneau, N. Bertho, M. Epardaud, J. Hope, A. Savina, S. Amigorena, M. Bonneau, M. Dalod, and I. Schwartz-Cornil. 2010. Existence of CD8 $\alpha$ -like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J. Immunol.* 185:3313–25. doi:10.4049/jimmunol.1000824.
- Corr, M., a von Damm, D.J. Lee, and H. Tighe. 1999. In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J. Immunol.* 163:4721–7.
- Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber. 1997. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology.* 92:388–95.
- Danko, I., P. Williams, H. Herweijer, G. Zhang, J.S. Latendresse, I. Bock, and J. a Wolff. 1997. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum. Mol. Genet.* 6:1435–43.
- Davis, M.M. 2008. A Prescription for Human Immunology. *Immunity.* 29:835–838.
- Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin. 2007. Immunité naturelle. *Med Sci.* 23:67–73.
- Démarchez, M. 2011. L'épiderme et la différenciation des kératinocytes.
- DeMuth, P.C., Y. Min, B. Huang, J. a Kramer, A.D. Miller, D.H. Barouch, P.T. Hammond, and D.J. Irvine. 2013. Polymer multilayer tattooing for enhanced DNA vaccination. *Nat. Mater.* 12:367–76. doi:10.1038/nmat3550.
- Denis-Mize, K.S., M. Dupuis, M.L. MacKichan, M. Singh, B. Doe, D. O'Hagan, J.B. Ulmer, J.J. Donnelly, D.M. McDonald, and G. Ott. 2000. Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells. *Gene Ther.* 7:2105–12. doi:10.1038/sj.gt.3301347.
- Denis-Mize, K.S., M. Dupuis, M. Singh, C. Woo, M. Ugozzoli, D.T. O'Hagan, J.J. Donnelly III, G. Ott, and D.M. McDonald. 2003. Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles. *Cell. Immunol.* 225:12–20. doi:10.1016/j.cellimm.2003.09.003.
- Diaz, C.M., A. Chiappori, L. Aurisicchio, A. Bagchi, J. Clark, S. Dubey, A. Fridman, J.C. Fabregas, J. Marshall, E. Scarselli, N. La Monica, G. Ciliberto, and A.J. Montero. 2013. Phase 1 studies of the safety and immunogenicity of electroporated HER2/CEA DNA vaccine followed by adenoviral boost immunization in patients with solid tumors. *J. Transl. Med.* 11:62. doi:10.1186/1479-5876-11-62.

- Dijkstra, D., H. Stark, P.L. Chazot, F.C. Shenton, R. Leurs, T. Werfel, and R. Gutzmer. 2008. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H4 receptor. *J. Invest. Dermatol.* 128:1696–703. doi:10.1038/sj.jid.5701250.
- Djuranovic, D., C. Oguey, and B. Hartmann. 2004. The role of DNA structure and dynamics in the recognition of bovine papillomavirus E2 protein target sequences. *J. Mol. Biol.* 339:785–96. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.078.
- Dolan, B.P., K.D. Gibbs, and S. Ostrand-Rosenberg. 2006. Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 177:6018–24.
- Dolan, J. w. Y.& B.P. 2011. Cross-dressers turn on T cells. *Nature.* 471:581–582. doi:10.1126/science.1201939.
- Donnelly, J.J., J.B. Ulmer, J.W. Shiver, and M. a Liu. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15:617–48. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.617.
- Van Drunen Littel-van den Hurk, S., and D. Hannaman. 2010. Electroporation for DNA immunization: clinical application. *Expert Rev. Vaccines.* 9:503–17. doi:10.1586/erv.10.42.
- Dubsky, P., H. Saito, M. Leogier, C. Dantin, J.E. Connolly, J. Banchereau, and a K. Palucka. 2007. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8<sup>+</sup> T cells to differentiate into CTL. *Eur. J. Immunol.* 37:1678–90. doi:10.1002/eji.200636329.
- Duffy, D., H. Perrin, V. Abadie, N. Benhabiles, A. Boissonnas, C. Liard, B. Descours, D. Reboulleau, O. Bonduelle, B. Verrier, N. Van Rooijen, C. Combadière, and B. Combadière. 2012. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* 37:917–29. doi:10.1016/j.immuni.2012.07.015.
- Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10:857–63. doi:10.1038/ni.1767.
- Dumas, A., and M. Pouliot. 2009. Le neutrophile: ennemi ou ami? *MS. Médecine Sci.* 25:699–704.
- Dutronc, Y., and S.A. Porcelli. 2002. The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. *Tissue Antigens.* 60:337–353. doi:10.1034/j.1399-0039.2002.600501.x.
- Ebert, L.M., S. Meuter, and B. Moser. 2006. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J. Immunol.* 176:4331–6.
- Elias, P., N. Matsuyoshi, and H. Wu. 2001. Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. *J. Cell Biol.* 153:243–249.
- Eloit M. 1998. Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. *INRA Prod. Anim.* 11:5–13.

- Ferran, M., E.R. Romeu, C. Rincón, M. Sagristà, A.M. Giménez Arnau, A. Celada, R.M. Pujol, P. Holló, H. Jókai, and L.F. Santamaria-Babí. 2013. Circulating CLA+ T lymphocytes as peripheral cell biomarkers in T-cell-mediated skin diseases. *Exp. Dermatol.* 22:439–42. doi:10.1111/exd.12154.
- Ferraro, B., M.P. Morrow, N. a Hutnick, T.H. Shin, C.E. Lucke, and D.B. Weiner. 2011. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin. Infect. Dis.* 53:296–302. doi:10.1093/cid/cir334.
- Flach, T.L., G. Ng, A. Hari, M.D. Desrosiers, P. Zhang, S.M. Ward, M.E. Seamone, A. Vilaysane, A.D. Mucsi, Y. Fong, E. Prenner, C.C. Ling, J. Tschopp, D. a Muruve, M.W. Amrein, and Y. Shi. 2011. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.* 17:479–87. doi:10.1038/nm.2306.
- Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronèse, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J. Immunol.* 177:7959–67.
- Flacher, V., C.H. Tripp, P. Stoitzner, B. Haid, S. Ebner, B. Del Frari, F. Koch, C.G. Park, R.M. Steinman, J. Idoyaga, and N. Romani. 2010. Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J. Invest. Dermatol.* 130:755–62. doi:10.1038/jid.2009.343.
- Flingai, S., M. Czerwonko, J. Goodman, S.B. Kudchodkar, K. Muthumani, and D.B. Weiner. 2013. Synthetic DNA Vaccines: Improved Vaccine Potency by Electroporation and Co-Delivered Genetic Adjuvants. *Front. Immunol.* 4:354. doi:10.3389/fimmu.2013.00354.
- Flynn, N.M., D.N. Forthal, C.D. Harro, F.N. Judson, K.H. Mayer, and M.F. Para. 2005. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 191:654–65. doi:10.1086/428404.
- Foster, C.A., H. Yokozeki, K. Rappersberger, F. Koning, B. Volc-Platzter, A. Rieger, J.E. Coligan, K. Wolff, and G. Stingl. 1990. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J. Exp. Med.* 171:997–1013.
- Fu, T.M., J.B. Ulmer, M.J. Caulfield, R.R. Deck, a Friedman, S. Wang, X. Liu, J.J. Donnelly, and M. a Liu. 1997. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol. Med.* 3:362–71.
- Fuentes-Duculan, J., M. Suárez-Fariñas, L.C. Zaba, K.E. Nograles, K.C. Pierson, H. Mitsui, C. a Pensabene, J. Kzhyskowska, J.G. Krueger, and M. a Lowes. 2010. A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 130:2412–22. doi:10.1038/jid.2010.165.
- Fujita, H., K.E. Nograles, T. Kikuchi, J. Gonzalez, J. a Carucci, and J.G. Krueger. 2009. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:21795–800. doi:10.1073/pnas.0911472106.

- Furio, L., I. Briotet, A. Journeaux, H. Billard, and J. Péguet-Navarro. 2010. Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells. *J. Invest. Dermatol.* 130:1345–54. doi:10.1038/jid.2009.424.
- Fynan, E.F., R.G. Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro, and H.L. Robinson. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:11478–82.
- Gao, Y., S. a Nish, R. Jiang, L. Hou, P. Licona-Limón, J.S. Weinstein, H. Zhao, and R. Medzhitov. 2013. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity.* 39:722–32. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.028.
- Gardner, M.B., and P. a Luciw. 2008. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J.* 49:220–55.
- Gaucher, D., R. Therrien, N. Kettaf, B.R. Angermann, G. Boucher, A. Filali-Mouhim, J.M. Moser, R.S. Mehta, D.R. Drake, E. Castro, R. Akondy, A. Rinfret, B. Yassine-Diab, E. a Said, Y. Chouikh, M.J. Cameron, R. Clum, D. Kelvin, R. Somogyi, L.D. Greller, R.S. Balderas, P. Wilkinson, G. Pantaleo, J. Tartaglia, E.K. Haddad, and R.-P. Sékaly. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J. Exp. Med.* 205:3119–31. doi:10.1084/jem.20082292.
- Geherin, S. a, S.R. Fintushel, M.H. Lee, R.P. Wilson, R.T. Patel, C. Alt, A.J. Young, J.B. Hay, and G.F. Debes. 2012. The skin, a novel niche for recirculating B cells. *J. Immunol.* 188:6027–35. doi:10.4049/jimmunol.1102639.
- Geijtenbeek, T.B.H., and S.I. Gringhuis. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9:465–79. doi:10.1038/nri2569.
- Geissmann, F., M.C. Dieu-Nosjean, C. Dezutter, J. Valladeau, S. Kayal, M. Leborgne, N. Brousse, S. Saeland, and J. Davoust. 2002. Accumulation of Immature Langerhans Cells in Human Lymph Nodes Draining Chronically Inflamed Skin. *J. Exp. Med.* 196:417–430. doi:10.1084/jem.20020018.
- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71–82.
- Gerdts, V., S. van D. Littel-van den Hurk, P.J. Griebel, and L.A. Babiuk. 2007. Use of animal models in the development of human vaccines. *Future Microbiol.* 2:667–75. doi:10.2217/17460913.2.6.667.
- Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. a Lira, E.R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206:3115–30. doi:10.1084/jem.20091756.
- Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X.-M. Dai, E.R. Stanley, G.J. Randolph, and M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7:265–73. doi:10.1038/ni1307.

- González-González, E., Y.-C. Kim, T.J. Speaker, R.P. Hickerson, R. Spitler, J.C. Birchall, M.F. Lara, R.-H. Hu, Y. Liang, N. Kirkiles-Smith, M.R. Prausnitz, L.M. Milstone, C.H. Contag, and R.L. Kaspar. 2011. Visualization of plasmid delivery to keratinocytes in mouse and human epidermis. *Sci. Rep.* 1:158. doi:10.1038/srep00158.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3:23–35. doi:10.1038/nri978.
- Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5:953–64. doi:10.1038/nri1733.
- Grage-Griebenow, E., H.D. Flad, and M. Ernst. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol.* 69:11–20.
- Graham, B.S., R. a Koup, M. Roederer, R.T. Bailer, M.E. Enama, Z. Moodie, J.E. Martin, M.M. McCluskey, B.K. Chakrabarti, L. Lamoreaux, C. a Andrews, P.L. Gomez, J.R. Mascola, and G.J. Nabel. 2006. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J. Infect. Dis.* 194:1650–60. doi:10.1086/509259.
- Greter, M., I. Lelios, P. Pelczar, G. Hoeffel, J. Price, M. Leboeuf, T.M. Kündig, K. Frei, F. Ginhoux, M. Merad, and B. Becher. 2012. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity.* 37:1050–60. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.001.
- Griffiths, C.E.M., R.J. Dearman, M. Cumberbatch, and I. Kimber. 2005. Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine.* 32:67–70. doi:10.1016/j.cyto.2005.07.011.
- Gröne, A. 2002. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88:1–12.
- Grønevik, E., I. Mathiesen, and T. Lømo. 2005. Early events of electroporation-mediated intramuscular DNA vaccination potentiate Th1-directed immune responses. *J. Gene Med.* 7:1246–54. doi:10.1002/jgm.760.
- Gutowska-Owsiak, D., and G.S. Ogg. 2012. The epidermis as an adjuvant. *J. Invest. Dermatol.* 132:940–8. doi:10.1038/jid.2011.398.
- Guttman-Yassky, E., M. a Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J. a Carucci, R. Bergman, and J.G. Krueger. 2007. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:1210–7. doi:10.1016/j.jaci.2007.03.006.
- Hammond, S., C. Tsonis, and K. Sellins. 2000. Transcutaneous immunization of domestic animals: opportunities and challenges. *Adv. Drug Deliv. Deliv. Rev.* 43:45–55.
- Haniffa, M., M. Collin, and F. Ginhoux. 2013. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. 120. 1st ed. Elsevier Inc.

- Haniffa, M., F. Ginhoux, X.-N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilken, M. Merad, and M. Collin. 2009. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* 206:371–85. doi:10.1084/jem.20081633.
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.-N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K.Y. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 37:60–73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012.
- Hansen, S.G., M. Piatak, A.B. Ventura, C.M. Hughes, R.M. Gilbride, J.C. Ford, K. Oswald, R. Shoemaker, Y. Li, M.S. Lewis, A.N. Gilliam, G. Xu, N. Whizin, B.J. Burwitz, S.L. Planer, J.M. Turner, A.W. Legasse, M.K. Axthelm, J. a Nelson, K. Früh, J.B. Sacha, J.D. Estes, B.F. Keele, P.T. Edlefsen, J.D. Lifson, and L.J. Picker. 2013. Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature*. 502:100–4. doi:10.1038/nature12519.
- Hatzioannou, T., and D.T. Evans. 2012. Animal models for HIV/AIDS research. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:852–67. doi:10.1038/nrmicro2911.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V Ravetch, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194:769–79.
- Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 102:2660–9. doi:10.1182/blood-2003-04-1078.
- Helft, J., F. Ginhoux, M. Bogunovic, and M. Merad. 2010. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev.* 234:55–75. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00885.x.
- Henri, S., L.F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2010. CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 207:189–206. doi:10.1084/jem.20091964.
- Herodin, F., P. Thullier, D. Garin, and M. Drouet. 2005. Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology. *Eur. Cytokine Netw.* 16:104–116.
- Hespel, C., and M. Moser. 2012. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* 42:2535–43. doi:10.1002/eji.201242480.
- Hirao, L. a, L. Wu, A. Satishchandran, A.S. Khan, R. Draghia-Akli, A.C. Finnefrock, A.J. Bett, M.R. Betts, D.R. Casimiro, N.Y. Sardesai, J.J. Kim, J.W. Shiver, and D.B. Weiner. 2010. Comparative analysis of immune responses induced by vaccination with SIV

- antigens by recombinant Ad5 vector or plasmid DNA in rhesus macaques. *Mol. Ther.* 18:1568–76. doi:10.1038/mt.2010.112.
- Hirsch, V.M., R.A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R.H. Purcell, and P.R. Johnson. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 339:389–92. doi:10.1038/339389a0.
- Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S.H.Y. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S.J. Conway, E.R. Stanley, J.K.Y. Chan, L.G. Ng, I.M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209:1167–81. doi:10.1084/jem.20120340.
- Hohl, T.M., A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack, and E.G. Pamer. 2009. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe*. 6:470–81. doi:10.1016/j.chom.2009.10.007.
- Hu, S.-L. 2005. Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 5:193–201.
- Hume, D. a. 2008. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J. Immunol.* 181:5829–35.
- Hutchison, S., R. a Benson, V.B. Gibson, A.H. Pollock, P. Garside, and J.M. Brewer. 2012. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J.* 26:1272–9. doi:10.1096/fj.11-184556.
- Hutnick, N. a, D.J.F. Myles, C.B. Bian, K. Muthumani, and D.B. Weiner. 2011. Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo. *Curr. Opin. Virol.* 1:233–40. doi:10.1016/j.coviro.2011.08.003.
- Iijima, N., L.M. Mattei, and A. Iwasaki. 2011. Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:284–9. doi:10.1073/pnas.1005201108.
- Imhof, B. a, and M. Aurrand-Lions. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 4:432–44. doi:10.1038/nri1375.
- Jakubzick, C., E.L. Gautier, S.L. Gibbings, D.K. Sojka, A. Schlitzer, T.E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J.R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D.W.H. Riches, W.M. Yokoyama, F. Ginhoux, P.M. Henson, and G.J. Randolph. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*. 39:599–610. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007.
- Jalah, R., V. Patel, V. Kulkarni, M. Rosati, C. Alicea, B. Ganneru, A. von Gegerfelt, W. Huang, Y. Guan, K.E. Broderick, N.Y. Sardesai, C. LaBranche, D.C. Montefiori, G.N. Pavlakis, and B.K. Felber. 2012. IL-12 DNA as molecular vaccine adjuvant increases the



- cytotoxic T cell responses and breadth of humoral immune responses in SIV DNA vaccinated macaques. *Hum. Vaccin. Immunother.* 8:1620–9. doi:10.4161/hv.21407.
- Jiang, X., R. a Clark, L. Liu, A.J. Wagers, R.C. Fuhlbrigge, and T.S. Kupper. 2012. Skin infection generates non-migratory memory CD8<sup>+</sup> T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature*. 483:227–31. doi:10.1038/nature10851.
- Johnson, R.P., J.D. Lifson, S.C. Czajak, K.S. Cole, K.H. Manson, R. Glickman, J. Yang, D.C. Montefiori, R. Montelaro, M.S. Wyand, and R.C. Desrosiers. 1999. -Highly Attenuated Vaccine Strains of Simian Immunodeficiency Virus Protect against Vaginal Challenge: Inverse Relationship of Degree of Protection. *J. Virol.* 73:4952–4961.
- Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, K.J. McDonald, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.-J.J. Chen, P.R. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J.E. Vulink, D.N.J. Hart, and K.J. Radford. 2010. Human CD141<sup>+</sup> (BDCA-3)<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207:1247–60. doi:10.1084/jem.20092140.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and a H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192:1213–22.
- Ju, X., G. Clark, and D. Hart. 2010. Review of human DC subtypes. *In* Dendritic Cell Protocols.
- Kaiserlian, D., and N. Etchart. 1999. Epicutaneous and transcutaneous immunization using DNA or proteins. *Eur. J. Dermatology.* 9:169–176.
- Kalali, B.N., G. Köllisch, J. Mages, T. Müller, S. Bauer, H. Wagner, J. Ring, R. Lang, M. Mempel, and M. Ollert. 2008. Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J. Immunol.* 181:2694–704.
- Kao, J., and D. Chen. 2002. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 2:395–403.
- Kaplan, D.H., M.O. Li, M.C. Jenison, W.D. Shlomchik, R. a Flavell, and M.J. Shlomchik. 2007. Autocrine/paracrine TGFβ1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 204:2545–52. doi:10.1084/jem.20071401.
- Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3:984–93. doi:10.1038/nri1246.
- Karlsson, I., B. Malleret, P. Brochard, B. Delache, J. Calvo, R. Le Grand, and B. Vaslin. 2007. Dynamics of T-cell responses and memory T cells during primary simian immunodeficiency virus infection in cynomolgus macaques. *J. Virol.* 81:13456–68. doi:10.1128/JVI.01619-07.
- Kasturi, S.P., I. Skountzou, R.A. Albrecht, D. Koutsouanos, T. Hua, H.I. Nakaya, R. Ravindran, S. Stewart, M. Alam, M. Kwissa, F. Villinger, N. Murthy, J. Steel, J. Jacob,

- R.J. Hogan, A. García-Sastre, R. Compans, and B. Pulendran. 2011. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature*. 470:543–7. doi:10.1038/nature09737.
- Kaushal, D., S. Mehra, P.J. Didier, and A.A. Lackner. 2012. The non-human primate model of tuberculosis. *J. Med. Primatol.* 41:191–201. doi:10.1111/j.1600-0684.2012.00536.x.
- Kemp, T.J., A. Hildesheim, M. Safaeian, J.G. Dauner, Y. Pan, C. Porras, J.T. Schiller, D.R. Lowy, R. Herrero, and L. a Pinto. 2011. HPV16/18 L1 VLP vaccine induces cross-neutralizing antibodies that may mediate cross-protection. *Vaccine*. 29:2011–4. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.001.
- Kennedy, D.W., and J.L. Abkowitz. 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood*. 90:986–93.
- Kim, N.W., M.S. Lee, K.R. Kim, J.E. Lee, K. Lee, J.S. Park, Y. Matsumoto, D.-G. Jo, H. Lee, D.S. Lee, and J.H. Jeong. 2014. Polyplex-releasing microneedles for enhanced cutaneous delivery of DNA vaccine. *J. Control. Release*. 179:11–17. doi:10.1016/j.jconrel.2014.01.016.
- Kis, E.E., G. Winter, and J. Myszchik. 2012. Devices for intradermal vaccination. *Vaccine*. 30:523–38. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.020.
- Klebanoff, C. a, S.E. Finkelstein, D.R. Surman, M.K. Lichtman, L. Gattinoni, M.R. Theoret, N. Grewal, P.J. Spiess, P. a Antony, D.C. Palmer, Y. Tagaya, S. a Rosenberg, T. a Waldmann, and N.P. Restifo. 2004. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:1969–74. doi:10.1073/pnas.0307298101.
- Klechevsky, E. 2013. Human dendritic cells - stars in the skin. *Eur. J. Immunol.* 43:3147–3155. doi:10.1002/eji.201343790.
- Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, L. Thompson-Snipes, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, a K. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*. 29:497–510. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.013.
- Koch, S., K. Kohl, E. Klein, D. von Bubnoff, and T. Bieber. 2006. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:163–8. doi:10.1016/j.jaci.2005.10.003.
- Kodihalli, S., H. Goto, D.L. Kobasa, S. Krauss, Y. Kawaoka, and R.G. Webster. 1999. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *J. Virol.* 73:2094–2098.
- Kool, M., T. Soullié, M. van Nimwegen, M.A.M. Willart, F. Muskens, S. Jung, H.C. Hoogsteden, H. Hammad, and B.N. Lambrecht. 2008. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205:869–82. doi:10.1084/jem.20071087.

- Korver, K., E.W. Boeschoten, R.T. Krediet, G. van Steenis, and P.T. Schellekens. 1987. Dose-response effects in immunizations with keyhole limpet haemocyanin and rabies vaccine: shift in some immunodeficiency states. *Clin. Exp. Immunol.* 70:328–35.
- Koup, R.A., and D.C. Douek. 2011. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1:a007252. doi:10.1101/cshperspect.a007252.
- Kraynyak, K. a, M. a Kutzler, N.J. Cisper, A.S. Khan, R. Draghia-Akli, N.Y. Sardesal, M.G. Lewis, J. Yan, and D.B. Weiner. 2010. Systemic immunization with CCL27/CTACK modulates immune responses at mucosal sites in mice and macaques. *Vaccine.* 28:1942–51. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.095.
- Krohn, K., I. Stanescu, V. Blazevic, T. Vesikari, A. Ranki, and M. Ustav. 2005. A DNA HIV-1 vaccine based on a fusion gene expressing non-structural and structural genes of consensus sequence of the A-C subtypes and the ancestor sequence of the F-H subtypes. Preclinical and clinical studies. *Microbes Infect.* 7:1405–13. doi:10.1016/j.micinf.2005.07.023.
- Kubo, A., K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki, and M. Amagai. 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* 206:2937–46. doi:10.1084/jem.20091527.
- Kumamoto, Y., M. Linehan, J.S. Weinstein, B.J. Laidlaw, J.E. Craft, and A. Iwasaki. 2013. CD301b<sup>+</sup> dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity.* 39:733–43. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.029.
- Kupper, T.S., and R.C. Fuhlbrigge. 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* 4:211–22. doi:10.1038/nri1310.
- Kuroda, E., C. Coban, and K.J. Ishii. 2013. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int. Rev. Immunol.* 32:209–20. doi:10.3109/08830185.2013.773326.
- Kurts, C., B.W.S. Robinson, and P. a Knolle. 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 10:403–14. doi:10.1038/nri2780.
- Kurugöl, Z., S. Erensoy, S. Akşit, A. Egemen, and A. Bilgiç. 2001. Low-dose intradermal administration of recombinant hepatitis B vaccine in children: 5-year follow-up study. *Vaccine.* 19:3936–9.
- Lambe, T. 2012. Novel viral vectored vaccines for the prevention of influenza. *Mol. Med.* 18:1153–60. doi:10.2119/molmed.2012.00147.
- Laurent, P.E., H. Bourhy, M. Fantino, P. Alchas, and J.A. Mikszta. 2010. Safety and efficacy of novel dermal and epidermal microneedle delivery systems for rabies vaccination in healthy adults. *Vaccine.* 28:5850–5856. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.062.
- Lebre, M.C., A.M.G. van der Aar, L. van Baarsen, T.M.M. van Capel, J.H.N. Schuitemaker, M.L. Kapsenberg, and E.C. de Jong. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* 127:331–41. doi:10.1038/sj.jid.5700530.

- Lenz, A., M. Heine, G. Schuler, and N. Romani. 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J. Clin. Invest.* 92:2587–96. doi:10.1172/JCI116873.
- Létourneau, S., E.-J. Im, T. Mashishi, C. Brereton, A. Bridgeman, H. Yang, L. Dorrell, T. Dong, B. Korber, A.J. McMichael, and T. Hanke. 2007. Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS One*. 2:e984. doi:10.1371/journal.pone.0000984.
- Letvin, N. 2002. Strategies for an HIV vaccine. *J. Clin. Invest.* 110:15–20. doi:10.1172/JCI200215985.The.
- Li, D., G. Romain, A.-L. Flamar, D. Duluc, M. Dullaers, X.-H. Li, S. Zurawski, N. Bosquet, A.K. Palucka, R. Le Grand, A. O'Garra, G. Zurawski, J. Banchereau, and S. Oh. 2012. Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 209:109–21. doi:10.1084/jem.20110399.
- Liu, J., R. Kjekken, I. Mathiesen, and D.H. Barouch. 2008. Recruitment of antigen-presenting cells to the site of inoculation and augmentation of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccine immunogenicity by in vivo electroporation. *J. Virol.* 82:5643–9. doi:10.1128/JVI.02564-07.
- Liu, L., Q. Zhong, T. Tian, K. Dubin, S.K. Athale, and T.S. Kupper. 2010. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat. Med.* 16:224–7. doi:10.1038/nm.2078.
- Liu, M. a. 2010. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity*. 33:504–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.004.
- Liu, M. a, B. Wahren, and G.B. Karlsson Hedestam. 2006. DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum. Gene Ther.* 17:1051–61. doi:10.1089/hum.2006.17.1051.
- Louz, D., H.E. Bergmans, B.P. Loos, and R.C. Hoeben. 2013. Animal models in virus research: their utility and limitations. *Crit. Rev. Microbiol.* 39:325–61. doi:10.3109/1040841X.2012.711740.
- Low, L., A. Mander, K. McCann, D. Dearnaley, T. Tjelle, I. Mathiesen, F. Stevenson, and C.H. Ottensmeier. 2009. DNA vaccination with electroporation induces increased antibody responses in patients with prostate cancer. *Hum. Gene Ther.* 20:1269–78. doi:10.1089/hum.2009.067.
- MacDonald, K.P. a, D.J. Munster, G.J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, and D.N.J. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 100:4512–20. doi:10.1182/blood-2001-11-0097.
- MacGregor, R.R., J.D. Boyer, K.E. Ugen, K.E. Lacy, S.J. Gluckman, M.L. Bagarazzi, M. a Chattergoon, Y. Baine, T.J. Higgins, R.B. Ciccarelli, L.R. Coney, R.S. Ginsberg, and D.B. Weiner. 1998. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human

- immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J. Infect. Dis.* 178:92–100.
- Malleret, B., I. Karlsson, B. Manéglier, P. Brochard, B. Delache, T. Andrieu, M. Muller-Trutwin, T. Beaumont, J.M. McCune, J. Banchereau, R. Le Grand, and B. Vaslin. 2008. Effect of SIVmac infection on plasmacytoid and CD1c+ myeloid dendritic cells in cynomolgus macaques. *Immunology*. 124:223–33. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02758.x.
- Malm, M., K. Krohn, and V. Blazevic. 2011. Immunization with dendritic cells transfected in vivo with HIV-1 plasmid DNA induces HIV-1-specific immune responses. *Arch. Virol.* 156:1607–10. doi:10.1007/s00705-011-1003-2.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E.R. Roux, S.D. Lyman, K. Shortman, and H.J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184:1953–62.
- Maraskovsky, E., E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C.R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M.E. Lebsack, and H.J. McKenna. 2000. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood*. 96:878–84.
- Marchesi, V.T., and J.L. Gowans. 1964. The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc. R. Soc. London. Ser. B*. 159:283–290.
- Marichal, T., K. Ohata, D. Bedoret, C. Mesnil, C. Sabatel, K. Kobiyama, P. Lekeux, C. Coban, S. Akira, K.J. Ishii, F. Bureau, and C.J. Desmet. 2011. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.* 17:996–1002. doi:10.1038/nm.2403.
- Martin, T., S.E. Parker, R. Hedstrom, T. Le, S.L. Hoffman, J. Norman, P. Hobart, and D. Lew. 1999. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum. Gene Ther.* 10:759–68. doi:10.1089/10430349950018517.
- Martinon, F., K. Kaldma, R. Sikut, S. Culina, G. Romain, M. Tuomela, M. Adojaan, A. Männik, U. Toots, T. Kivisild, J. Morin, P. Brochard, B. Delache, A. Tripiciano, F. Ensoli, I. Stanescu, R. Le Grand, and M. Ustav. 2009. Persistent immune responses induced by a human immunodeficiency virus DNA vaccine delivered in association with electroporation in the skin of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 20:1291–307. doi:10.1089/hum.2009.044.
- Martinon, F., S. Krishnan, G. Lenzen, R. Magné, E. Gomard, J.G. Guillet, J.P. Lévy, and P. Meulien. 1993. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur. J. Immunol.* 23:1719–22. doi:10.1002/eji.1830230749.
- Mathers, A.R., B.M. Janelisins, J.P. Rubin, O.A. Tkacheva, W.J. Shufesky, S.C. Watkins, A.E. Morelli, and A.T. Larregina. 2009. Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J. Immunol.* 182:921–33.

- Matthews, K., N.P.Y. Chung, P.J. Klasse, J.P. Moore, and R.W. Sanders. 2012. Potent induction of antibody-secreting B cells by human dermal-derived CD14<sup>+</sup> dendritic cells triggered by dual TLR ligation. *J. Immunol.* 189:5729–44. doi:10.4049/jimmunol.1200601.
- Maxwell, J.R., R. Yadav, R.J. Rossi, C.E. Ruby, A.D. Weinberg, H.L. Aguila, and A.T. Vella. 2006. IL-18 bridges innate and adaptive immunity through IFN-gamma and the CD134 pathway. *J. Immunol.* 177:234–45.
- McLachlan, J.B., C.P. Shelburne, J.P. Hart, S. V Pizzo, R. Goyal, R. Brooking-Dixon, H.F. Staats, and S.N. Abraham. 2008. Mast cell activators: a new class of highly effective vaccine adjuvants. *Nat. Med.* 14:536–41. doi:10.1038/nm1757.
- Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8:935–47. doi:10.1038/nri2455.
- Merad, M., M.G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I.L. Weissman, J.G. Cyster, and E.G. Engleman. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 3:1135–41. doi:10.1038/ni852.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31:563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Meurens, F., A. Summerfield, H. Nauwynck, L. Saif, and V. Gerdts. 2012. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 20:50–57.
- Miller, L.S., and R.L. Modlin. 2007. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J. Invest. Dermatol.* 127:262–3. doi:10.1038/sj.jid.5700559.
- Moingeon, P., J. Haensler, and a Lindberg. 2001. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine.* 19:4363–72.
- Moiré, N., S. Dion, M. Lebrun, J.-F. Dubremetz, and I. Dimier-Poisson. 2009. Mic1-3KO tachyzoite a live attenuated vaccine candidate against toxoplasmosis derived from a type I strain shows features of type II strain. *Exp. Parasitol.* 123:111–7. doi:10.1016/j.exppara.2009.06.003.
- Mölder, T., M. Adojaan, K. Kaldma, M. Ustav, and R. Sikut. 2009. Elicitation of broad CTL response against HIV-1 by the DNA vaccine encoding artificial multi-component fusion protein MultiHIV--study in domestic pigs. *Vaccine.* 28:293–8. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.054.
- Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. Röllinghoff. 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 23:1595–601. doi:10.1002/eji.1830230730.

- Moody, M.A., S. Santra, N. a Vandergrift, L.L. Sutherland, T.C. Gurley, M.S. Drinker, A. a Allen, S.-M. Xia, R.R. Meyerhoff, R. Parks, K.E. Lloyd, D. Easterhoff, S.M. Alam, H.-X. Liao, B.M. Ward, G. Ferrari, D.C. Montefiori, G.D. Tomaras, R. a Seder, N.L. Letvin, and B.F. Haynes. 2014. TLR-7/8 and 9 Agonists Cooperate to Enhance HIV-1 Envelope Antibody Responses in Rhesus Macaques. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.03309-13.
- Moorthy, V.S., E.B. Imoukhuede, S. Keating, M. Pinder, D. Webster, M. a Skinner, S.C. Gilbert, G. Walraven, and A.V.S. Hill. 2004. Phase 1 evaluation of 3 highly immunogenic prime-boost regimens, including a 12-month reboosting vaccination, for malaria vaccination in Gambian men. *J. Infect. Dis.* 189:2213–9. doi:10.1086/421118.
- Morita, K., Y. Miyachi, and M. Furuse. 2011. Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur. J. Dermatol.* 21:12–7. doi:10.1684/ejd.2010.1192.
- Mosser, D.M., and J.P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8:958–69. doi:10.1038/nri2448.
- Murakami, R., K. Denda-Nagai, S. Hashimoto, S. Nagai, M. Hattori, and T. Irimura. 2013. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One.* 8:e73270. doi:10.1371/journal.pone.0073270.
- Murray, P.J., and T. a Wynn. 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 89:557–63. doi:10.1189/jlb.0710409.
- Nagao, K., F. Ginhoux, W. W. Leitner, S.-I. Motegi, C. L. Bennett, B. E. Clausen, M. Merad, C. Udey, and Mark. 2009. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *PNAS.* 106:3312–3317.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6:769–76. doi:10.1038/ni1223.
- Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173–82. doi:10.1038/nri1785.
- Nestle, F., P. Di Meglio, J.-Z. Qin, and B.J. Nickoloff. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. ....* 9:679–691. doi:10.1038/nri2622.Skin.
- Nestle, F.O., X.G. Zheng, C.B. Thompson, L. a Turka, and B.J. Nickoloff. 1993. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.* 151:6535–45.
- Nishiya, T., E. Kajita, S. Miwa, and A.L. Defranco. 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 280:37107–17. doi:10.1074/jbc.M504951200.
- Novak, N., R. Valenta, B. Bohle, S. Laffer, J. Haberstok, S. Kraft, and T. Bieber. 2004. FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-

- cell phenotypes in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:949–57.  
doi:10.1016/j.jaci.2004.02.005.
- Ochoa, M.T., A. Loncaric, S.R. Krutzik, T.C. Becker, and R.L. Modlin. 2008. “Dermal dendritic cells” comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J. Invest. Dermatol.* 128:2225–31. doi:10.1038/jid.2008.56.
- Oehler, L., O. Majdic, W.F. Pickl, J. Stöckl, E. Riedl, J. Drach, K. Rappersberger, K. Geissler, and W. Knapp. 1998. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J. Exp. Med.* 187:1019–28.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, and G. Hintzen. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 21:279–288.
- Orr, M.T., E. a Beebe, T.E. Hudson, J.J. Moon, C.B. Fox, S.G. Reed, and R.N. Coler. 2014. A Dual TLR Agonist Adjuvant Enhances the Immunogenicity and Protective Efficacy of the Tuberculosis Vaccine Antigen ID93. *PLoS One.* 9:e83884.  
doi:10.1371/journal.pone.0083884.
- Ottenhoff, T. 2009. Overcoming the global crisis: “Yes, we can”, but also for TB? *Eur. J. Immunol.* 39:2014–2020. doi:DOI 10.1002/eji.200939518.
- Ouchi, T., A. Kubo, M. Yokouchi, T. Adachi, T. Kobayashi, D.Y. Kitashima, H. Fujii, B.E. Clausen, S. Koyasu, M. Amagai, and K. Nagao. 2011. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Exp. Med.* 208:2607–13. doi:10.1084/jem.20111718.
- Ouwehand, K., S.J. a M. Santegoets, D.P. Bruynzeel, R.J. Scheper, T.D. de Gruijl, and S. Gibbs. 2008. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.* 38:3050–9. doi:10.1002/eji.200838384.
- Palframan, R.T., S. Jung, G. Cheng, W. Weninger, Y. Luo, M. Dorf, D.R. Littman, B.J. Rollins, H. Zweerink, a Rot, and U.H. von Andrian. 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* 194:1361–73.
- Pancharoen, C., J. Mekmullica, U. Thisyakorn, S. Kasempimolporn, H. Wilde, and C. Herzog. 2005. Reduced-dose intradermal vaccination against hepatitis A with an aluminum-free vaccine is immunogenic and can lower costs. *Clin. Infect. Dis.* 41:1537–40.  
doi:10.1086/497266.
- Pasteur, L., M. Chamberland, and M. Roux. 1881. De l’atténuation des virus et de leur retour à la virulence. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 92:429–435.
- Pearnton, M., S.-M. Kang, J.-M. Song, A. V Anstey, M. Ivory, R.W. Compans, and J.C. Birchall. 2010. Changes in human Langerhans cells following intradermal injection of influenza virus-like particle vaccines. *PLoS One.* 5:e12410.  
doi:10.1371/journal.pone.0012410.



- Peiser, M., J. Koeck, C.J. Kirschning, B. Wittig, and R. Wanner. 2008. Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4+T cell stimulatory capacity. *J. Leukoc. Biol.* 83:1118–27. doi:10.1189/jlb.0807567.
- Peng, B., Y. Zhao, L. Xu, and Y. Xu. 2007. Electric pulses applied prior to intramuscular DNA vaccination greatly improve the vaccine immunogenicity. *Vaccine.* 25:2064–73. doi:10.1016/j.vaccine.2006.11.042.
- Perrie, Y., A.R. Mohammed, D.J. Kirby, S.E. McNeil, and V.W. Bramwell. 2008. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int. J. Pharm.* 364:272–80. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.04.036.
- Playford, E.G., P.G. Hogan, A.S. Bansal, K. Harrison, D. Drummond, D.F.M. Looke, and M. Whitby. 2002. Intradermal recombinant hepatitis B vaccine for healthcare workers who fail to respond to intramuscular vaccine. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23:87–90. doi:10.1086/502012.
- Plotkin, S. a. 2005. Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* 11:S5–11. doi:10.1038/nm1209.
- Pokorna, D., I. Rubio, and M. Müller. 2008. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet. Vaccines Ther.* 6:4. doi:10.1186/1479-0556-6-4.
- Porcheray, F., S. Viaud, a-C. Rimaniol, C. Léone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, and G. Gras. 2005. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 142:481–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.
- Porgador, A., and K. Irvine. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188:1075–1082.
- Poulin, L.F., S. Henri, B. de Bovis, E. Devilard, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2007. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 204:3119–31. doi:10.1084/jem.20071724.
- Propst, T., A. Propst, K. Lhotta, W. Vogel, and P. Ko. 1998. or Subcutaneous Vaccination. 32:1041–1045.
- Prost-Squarcioni, C. 2006. Histologie de la peau et des follicules pileux. *M/S médecine Sci.* 22:131–137.
- Pulendran, B., and R. Ahmed. 2011. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12:509–517.
- Querec, T., S. Bennouna, S. Alkan, Y. Laouar, K. Gorden, R. Flavell, S. Akira, R. Ahmed, and B. Pulendran. 2006. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 203:413–24. doi:10.1084/jem.20051720.

- Ravindran, R., N. Khan, H.I. Nakaya, S. Li, J. Loebbermann, M.S. Maddur, Y. Park, D.P. Jones, P. Chappert, J. Davoust, D.S. Weiss, H.W. Virgin, D. Ron, and B. Pulendran. 2014. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science*. 343:313–7. doi:10.1126/science.1246829.
- Raz, E., D. a Carson, S.E. Parker, T.B. Parr, a M. Abai, G. Aichinger, S.H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, and M. a Yankauckas. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:9519–23.
- Renn, C.N., D.J. Sanchez, M.T. Ochoa, A.J. Legaspi, C.-K. Oh, P.T. Liu, S.R. Krutzik, P.A. Sieling, G. Cheng, and R.L. Modlin. 2006. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J. Immunol.* 177:298–305.
- Rerks-Ngarm, S. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361:2209–2220.
- Rizzuto, G., M. Cappelletti, D. Maione, R. Savino, D. Lazzaro, P. Costa, I. Mathiesen, R. Cortese, G. Ciliberto, R. Laufer, N. La Monica, and E. Fattori. 1999. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:6417–22.
- Robbins, S.H., T. Walzer, D. Dembélé, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F.R. Sharp, S. Chan, P. Kastner, and M. Dalod. 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9:R17. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r17.
- Rodero, M.P., and K. Khosrotehrani. 2010. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3:643–53.
- Rollier, C.S., A. Reyes-Sandoval, M.G. Cottingham, K. Ewer, and A.V.S. Hill. 2011. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr. Opin. Immunol.* 23:377–82. doi:10.1016/j.coi.2011.03.006.
- Romain, G., E. Van Gulck, O. Epaulard, S. Oh, D. Li, G. Zurawski, S. Zurawski, A. Cosma, L. Adam, C. Chapon, B. Todorova, J. Banchereau, N. Dereuddre-Bosquet, G. Vanham, R. Le Grand, and F. Martinon. 2012. CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur. J. Immunol.* 42:2019–2033. doi:10.1002/eji.201242478.
- Romani, N., B.E. Clausen, and P. Stoitzner. 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* 234:120–141. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x.
- Roos, A.-K., F. Eriksson, J. a Timmons, J. Gerhardt, U. Nyman, L. Gudmundsdotter, A. Bråve, B. Wahren, and P. Pisa. 2009. Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. *PLoS One*. 4:e7226. doi:10.1371/journal.pone.0007226.

- Rosati, M., A. Valentin, R. Jalah, V. Patel, A. von Gegerfelt, C. Bergamaschi, C. Alicea, D. Weiss, J. Treece, R. Pal, P.D. Markham, E.T. a Marques, J.T. August, A. Khan, R. Draghia-Akli, B.K. Felber, and G.N. Pavlakis. 2008. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine*. 26:5223–9. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.090.
- Salomon, B., and J. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 19:225–252.
- Saroja, C., P. Lakshmi, and S. Bhaskaran. 2011. Recent trends in vaccine delivery systems: A review. *Int. J. Pharm. Investig.* 1:64–74. doi:10.4103/2230-973X.82384.
- Saxena, M., T.T.H. Van, F.J. Baird, P.J. Coloe, and P.M. Smooker. 2013. Pre-existing immunity against vaccine vectors--friend or foe? *Microbiology*. 159:1–11. doi:10.1099/mic.0.049601-0.
- Schmook, F.P., J.G. Meingassner, and A. Billich. 2001. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 215:51–56.
- Seneschal, J., R. a Clark, A. Gehad, C.M. Baecher-Allan, and T.S. Kupper. 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity*. 36:873–84. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.018.
- Serbina, N. V, T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, and E.G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity*. 19:59–70. doi:10.1016/S1074-7613(03)00171-7.
- Seré, K., J.-H. Baek, J. Ober-Blöbaum, G. Müller-Newen, F. Tacke, Y. Yokota, M. Zenke, and T. Hieronymus. 2012. Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity*. 37:905–916.
- Shedlock, D.J., and D.B. Weiner. 2000. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leukoc. Biol.* 68:793–806.
- Shimizu, H. 2007. Shimizu's textbook of dermatology.
- Shiver, J.W., T. Fu, L. Chen, D.R. Casimiro, M. Davies, R.K. Evans, Z. Zhang, A.J. Simon, W.L. Trigona, S.A. Dubey, L. Huang, V.A. Harris, R.S. Long, X. Liang, L. Handt, W.A. Schleif, L. Zhu, D.C. Freed, N. V Persaud, L. Guan, K.S. Punt, A. Tang, M. Chen, K.A. Wilson, K.B. Collins, G.J. Heidecker, V.R. Fernandez, H.C. Perry, J.G. Joyce, K.M. Grimm, J.C. Cook, P.M. Keller, D.S. Kresock, H. Mach, R.D. Troutman, L.A. Isopi, D.M. Williams, Z. Xu, K.E. Bohannon, D.B. Volkin, D.C. Monte, A. Miura, G.R. Krivulka, M.A. Lifton, M.J. Kuroda, N.L. Letvin, M.J. Caul, A.J. Bett, R. Youil, D.C. Kaslow, and E.A. Emini. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti- immunodeficiency-virus immunity. *Nature*. 415:331–335.
- Shklovskaya, E., B.J. O'Sullivan, L.G. Ng, B. Roediger, R. Thomas, W. Weninger, and B. Fazekas de St Groth. 2011. Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:18049–54. doi:10.1073/pnas.1110076108.

- Siegal, F.P., N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and T.-J. Liu. 1999. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* (80-. ). 284:1835–1837. doi:10.1126/science.284.5421.1835.
- Sigmundsdottir, H., and E.C. Butcher. 2008. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol.* 9:981–7. doi:10.1038/ni.f.208.
- Sigmundsdottir, H., J. Pan, G.F. Debes, C. Alt, A. Habtezion, D. Soler, and E.C. Butcher. 2007. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat. Immunol.* 8:285–93. doi:10.1038/ni1433.
- Smith, K. a. 2011. Edward jenner and the small pox vaccine. *Front. Immunol.* 2:21. doi:10.3389/fimmu.2011.00021.
- Smith, K. a. 2013. Smallpox: can we still learn from the journey to eradication? *Indian J. Med. Res.* 137:895–9.
- Song, J.-M., Y.-C. Kim, E. O, R.W. Compans, M.R. Prausnitz, and S.-M. Kang. 2012. DNA vaccination in the skin using microneedles improves protection against influenza. *Mol. Ther.* 20:1472–80. doi:10.1038/mt.2012.69.
- Spies, B., H. Hochrein, M. Vabulas, K. Huster, D.H. Busch, F. Schmitz, A. Heit, and H. Wagner. 2003. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J. Immunol.* 171:5908–12.
- Van Spriel, A.B., and E.C. de Jong. 2013. Dendritic cell science: more than 40 years of history. *J. Leukoc. Biol.* 93:33–8. doi:10.1189/jlb.0512263.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:685–711. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040.
- Steinman, R.M., and M.D. Witmer. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:5132–6.
- Stoitzner, P., N. Romani, A.D. McLellan, C.H. Tripp, and S. Ebner. 2010. Isolation of skin dendritic cells from mouse and man. *Methods Mol. Biol.* 595:235–48. doi:10.1007/978-1-60761-421-0\_16.
- Stout, R., C. Jiang, and B. Matta. 2005. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 175:342–349.
- Stout, R., and J. Suttles. 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76:509–513. doi:10.1189/jlb.0504272.Journal.

- Su, B., J. Wang, G. Zhao, X. Wang, J. Li, and B. Wang. 2012. Sequential administration of cytokine genes to enhance cellular immune responses and CD4 (+) T memory cells during DNA vaccination. *Hum. Vaccin. Immunother.* 8:1659–67. doi:10.4161/hv.22105.
- Takahara, K., Y. Omatsu, Y. Yashima, Y. Maeda, S. Tanaka, T. Iyoda, B. Clusen, K. Matsubara, J. Letterio, R.M. Steinman, Y. Matsuda, and K. Inaba. 2002. Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. *Int. Immunol.* 14:433–444.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140:805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tamoutounour, S., M. Guillemins, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri. 2013. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity.* 39:925–938.
- Tang, D.C., M. DeVit, and S.A. Johnston. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356:152–4. doi:10.1038/356152a0.
- Theiler, M., and H.H. Smith. 1937. the Use of Yellow Fever Virus Modified By in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J. Exp. Med.* 65:787–800.
- Thera, M., and C. Plowe. 2012. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu. Rev. Med.* 63:345–357. doi:10.1146/annurev-med-022411-192402.Vaccines.
- Toichi, E., K.Q. Lu, A.R. Swick, T.S. McCormick, and K.D. Cooper. 2008. Skin-infiltrating monocytes/macrophages migrate to draining lymph nodes and produce IL-10 after contact sensitizer exposure to UV-irradiated skin. *J. Invest. Dermatol.* 128:2705–2715. doi:10.1038/jid.2008.137.
- Torres, C.A., A. Iwasaki, B.H. Barber, and H.L. Robinson. 1997. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J. Immunol.* 158:4529–32.
- Tudor, D., C. Dubuquoy, V. Gaboriau, F. Lefèvre, B. Charley, and S. Riffault. 2005. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine.* 23:1258–64. doi:10.1016/j.vaccine.2004.09.001.
- Ueno, H., N. Schmitt, E. Klechevsky, A. Pedroza-Gonzalez, T. Matsui, G. Zurawski, S. Oh, J. Fay, V. Pascual, J. Banchereau, and K. Palucka. 2010. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol. Rev.* 234:199–212. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00884.x.
- Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Felgner, V.J. Dwarki, S.H. Gromkowski, R.R. Deck, C.M. DeWitt, and a Friedman. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 259:1745–9.
- Ulmer, J.B., B. Wahren, and M. a Liu. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.* 12:216–22. doi:10.1016/j.molmed.2006.03.007.

- Valladeau, J. 2006. Les cellules de Langerhans. *M/S médecine Sci.* 22:144–148.
- Valladeau, J., and S. Saeland. 2005. Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17:273–83. doi:10.1016/j.smim.2005.05.009.
- Vardas, E., I. Stanescu, M. Leinonen, K. Ellefsen, G. Pantaleo, M. Valtavaara, M. Ustav, and K. Reijonen. 2012. Indicators of therapeutic effect in FIT-06, a Phase II trial of a DNA vaccine, GTU(®)-Multi-HIVB, in untreated HIV-1 infected subjects. *Vaccine.* 30:4046–54. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.007.
- Vasan, S., a Hurley, S. Schlesinger, D. Hannaman, D. Gardiner, D. Dugin, M. Boente-Carrera, R. Vittorino, M. Caskey, J. Andersen, Y. Huang, J. Cox, T. Tarragona, D. Gill, H. Cheeseman, L. Clark, L. Dally, C. Smith, C. Schmidt, H. Park, E. Sayeed, J. Gilmour, P. Fast, R. Bernard, and D. Ho. 2009. OA05-01. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of ADVAX, a DNA-based HIV-1 vaccine candidate, in healthy volunteers. *Retrovirology.* 6:O31. doi:10.1186/1742-4690-6-S3-O31.
- Vasan, S., A. Hurley, S.J. Schlesinger, D. Hannaman, D.F. Gardiner, D.P. Dugin, M. Boente-Carrera, R. Vittorino, M. Caskey, J. Andersen, Y. Huang, J.H. Cox, T. Tarragona-Fiol, D.K. Gill, H. Cheeseman, L. Clark, L. Dally, C. Smith, C. Schmidt, H.H. Park, J.T. Kopycinski, J. Gilmour, P. Fast, R. Bernard, and D.D. Ho. 2011. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One.* 6:e19252. doi:10.1371/journal.pone.0019252.
- Vecchi, S., S. Bufali, T. Uno, T. Wu, L. Arcidiacono, S. Filippini, F. Rigat, and D. O'Hagan. 2014. Conjugation of a TLR7 agonist and antigen enhances protection in the S. pneumoniae murine infection model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* doi:10.1016/j.ejpb.2014.01.002.
- Verstrepen, B.E., A.D. Bins, C.S. Rollier, P. Mooij, G. Koopman, N.C. Sheppard, Q. Sattentau, R. Wagner, H. Wolf, T.N.M. Schumacher, J.L. Heeney, and J.B. a G. Haanen. 2008. Improved HIV-1 specific T-cell responses by short-interval DNA tattooing as compared to intramuscular immunization in non-human primates. *Vaccine.* 26:3346–51. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.091.
- Villablanca, E.J., and J.R. Mora. 2008. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur. J. Immunol.* 38:2975–80. doi:10.1002/eji.200838919.
- Van Vliet, S.J., J. den Dunnen, S.I. Gringhuis, T.B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk. 2007. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19:435–40. doi:10.1016/j.coi.2007.05.006.
- Vogel, D.Y.S., E.J.F. Vereyken, J.E. Glim, P.D. a M. Heijnen, M. Moeton, P. van der Valk, S. Amor, C.E. Teunissen, J. van Horssen, and C.D. Dijkstra. 2013. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J. Neuroinflammation.* 10:35. doi:10.1186/1742-2094-10-35.
- Wakim, L.M., and M.J. Bevan. 2011. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature.* 471:629–32. doi:10.1038/nature09863.

- Walther, W., R. Siegel, D. Kobelt, T. Knösel, M. Dietel, A. Bembenek, J. Aumann, M. Schleef, R. Baier, U. Stein, and P.M. Schlag. 2008. Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 14:7545–53. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0412.
- Wang, R. 1998. Induction of Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Humans by a Malaria DNA Vaccine. *Science* (80-. ). 282:476–480. doi:10.1126/science.282.5388.476.
- Wang, S., D.J. Farfan-Arribas, S. Shen, T.-H.W. Chou, A. Hirsch, F. He, and S. Lu. 2006. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*. 24:4531–40. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.023.
- Wang, X.-Y., X. Yao, Y.-M. Wan, B. Wang, J.-Q. Xu, and Y.-M. Wen. 2013. Responses to multiple injections with alum alone compared to injections with alum adsorbed to proteins in mice. *Immunol. Lett.* 149:88–92. doi:10.1016/j.imlet.2012.11.005.
- Wang, Z., P.J. Troilo, X. Wang, T.G. Griffiths, S.J. Pacchione, a B. Barnum, L.B. Harper, C.J. Pauley, Z. Niu, L. Denisova, T.T. Follmer, G. Rizzuto, G. Ciliberto, E. Fattori, N.L. Monica, S. Manam, and B.J. Ledwith. 2004. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 11:711–21. doi:10.1038/sj.gt.3302213.
- Weiland, O., G. Ahlén, H. Diepolder, M.-C. Jung, S. Levander, M. Fons, I. Mathiesen, N.Y. Sardesai, A. Vahlne, L. Frelin, and M. Sällberg. 2013. Therapeutic DNA vaccination using in vivo electroporation followed by standard of care therapy in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Mol. Ther.* 21:1796–805. doi:10.1038/mt.2013.119.
- Wolff, J. a, R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, a Jani, and P.L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 247:1465–8.
- Wollenberg, A., S. Kraft, D. Hanau, and T. Bieber. 1996. Immunomorphological and Ultrastructural Characterization of Langerhans Cells and a Novel, Inflammatory Dendritic Epidermal Cell (IDEC) Population in Lesional Skin of Atopic Eczema. *J. Invest. Dermatol.* 106:446–453. doi:10.1111/1523-1747.ep12343596.
- Wollenberg, A., and M. Mommaas. 2002. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 118:327–334.
- Yan, G., G. Zhang, X. Fang, Y. Zhang, C. Li, F. Ling, D.N. Cooper, Q. Li, Y. Li, A.J. van Gool, H. Du, J. Chen, R. Chen, P. Zhang, Z. Huang, J.R. Thompson, Y. Meng, Y. Bai, J. Wang, M. Zhuo, T. Wang, Y. Huang, L. Wei, J. Li, Z. Wang, H. Hu, P. Yang, L. Le, P.D. Stenson, B. Li, X. Liu, E. V Ball, N. An, Q. Huang, Y. Zhang, W. Fan, X. Zhang, Y. Li, W. Wang, M.G. Katze, B. Su, R. Nielsen, H. Yang, J. Wang, X. Wang, and J. Wang. 2011. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques. *Nat. Biotechnol.* 29:1019–23. doi:10.1038/nbt.1992.

- Yona, S., K.-W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. a Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 38:79–91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001.
- Yssel, H., and A. Bensussan. 2010. Existe-t-il dans la peau une nouvelle population lymphocytaire Th22 distincte des lymphocytes Th17 ? *M/S médecine Sci*. 26:12–14.
- Zaba, L.C., J. Fuentes-Duculan, R.M. Steinman, J.G. Krueger, and M.A. Lowes. 2007. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J. Clin. Invest*. 117:2517–25. doi:10.1172/JCI32282.
- Zaba, L.C., J.G. Krueger, and M. a Lowes. 2009. Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. *J. Invest. Dermatol*. 129:302–8. doi:10.1038/jid.2008.225.
- Zeyda, M., D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Györi, G.J. Zlabinger, and T.M. Stulnig. 2007. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int. J. Obes. (Lond)*. 31:1420–8. doi:10.1038/sj.ijo.0803632.
- Zhang, L., E. Nolan, S. Kreitschitz, and D.P. Rabussay. 2002. Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1572:1–9.
- Zhao, Y.-G., B. Peng, H. Deng, G. Chen, F. Yang, M. Shao, H. Lu, Y. Li, J. Peng, L. Xu, and Y. Xu. 2006. Anti-HBV immune responses in rhesus macaques elicited by electroporation mediated DNA vaccination. *Vaccine*. 24:897–903. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.093.
- Zheng, D., Y. Yi, and Z. Chen. 2012. Development of live-attenuated influenza vaccines against outbreaks of H5N1 influenza. *Viruses*. 4:3589–605. doi:10.3390/v4123589.
- Zinkernagel, R.M., and P.C. Doherty. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 248:701–702. doi:10.1038/248701a0.



La compréhension des mécanismes immunologiques précoces mis en place suite à l'administration de vaccin est encore de nos jours largement méconnue. Dans le but d'améliorer cette compréhension, nous avons étudié les événements cellulaires et moléculaires induits suite à l'injection d'un vaccin ADN de type auxo-GTU par voie intradermique associé à une électroporation (EP). Nos résultats montrent un recrutement précoce de cellules inflammatoires dans l'épiderme et le derme, une activation des cellules de Langerhans ainsi que leur diminution subséquente pouvant indiquer leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces effets semblent largement dus au processus d'EP indépendamment de la présence du vaccin, ce qui est en faveur d'un rôle adjuvant de l'EP dans la réponse vaccinale. Au niveau moléculaire, nous avons constaté une production de cytokines et chimiokines intervenant dans la réponse inflammatoire clairement augmentée en présence d'ADN, ce qui suggère que la présence du vaccin est cruciale dans la mise en place du microenvironnement inflammatoire favorable à l'activation cellulaire.

**Mots clés :** cellules présentatrices d'antigènes, cellules dendritiques, cellules immunitaires, peau, vaccin ADN, électroporation, primate non humain

**SERVICE D'IMMUNOVIROLOGIE, CEA**

**18 ROUTE DU PANORAMA**

**92265 FONTENAY-AUX-ROSES CEDEX**

**PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES**

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11**

**UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »**

**5, rue Jean Baptiste Clément**

**92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex**